ÉRICA DE ALMEIDA DUQUE

EFEITO DOS GLICOCORTICÓIDES NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR LPS EM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS FRONTO-CORTICAIS DE RATOS NEONATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para o título de mestre em Ciências

SÃO PAULO
2013

ÉRICA DE ALMEIDA DUQUE

EFEITO DOS GLICOCORTICÓIDES NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR LPS EM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS FRONTO-CORTICAIS DE RATOS NEONATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para o título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª. Drª. Carolina Demarchi Munhoz

Versão Original

SÃO PAULO
2013

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

© reprodução total

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.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação.

Versão do título para o inglês: Glucocorticoids effects on LPS-induced inflammation in rat primary frontal cortex cultures.

1. Hormônios Glicocorticóides 2. Inflamação 3. Córtex Cerebral 4. Fatores de Transcrição 5. Astrócitos 6. Microglia I. Munhoz, Profa. Dra. Carolina Demarchi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB020/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Érica de Almeida Duque.

Título da Dissertação: Efeitos dos glicocorticóides na inflamação induzida por LPS em culturas primárias fronto-corticais de ratos neonatos.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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 **132** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carolina Demarchi Munhoz de Souza, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos citoprotetores do estrógeno na potencialização da resposta inflamatória mediada por glicocorticóides na neuroinflamação induzida por LPS** do qual participam o(s) alunos **Erica de Almeida Duque, Dielly Catarina Favacho Lopes, Rafaela Pestana Batalhote, Camila Sayuri Matsubara, Lais Ferreira Rodrigues e o pesquisador Cristoforo Scavone,** 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 **06.12.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA – ICB/USP

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

AGRADECIMENTOS

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, mesmo que em seu jeito diferente.

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

Ao meu namorado e amigo, Luís Felipe Olivier de Macedo, pelo apoio, carinho, paciência, compreensão pela minha ausência, e por nunca me deixar desistir.

A toda a minha família, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, Carolina Demarchi Munhoz, a quem admiro imensamente, pela compreensão, apoio e credibilidade, mesmo quando não eu mesma não acreditava. Muito obrigada pela oportunidade.

À doutoranda e amiga, Dielly Catrina Favacho Lopes, pelos inúmeros ensinamentos técnicos e científicos, e por toda ajuda dada na realização dos experimentos sempre que eu precisava, sabia que existia alguém com quem poderia contar.

Ao mestrando e amigo, Leonardo Novaes Santana, pelos inúmeros ensinamentos científicos, ajuda dada nos experimentos, e pelo exemplo que é.

Aos colegas do laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, Nilton, Jennifer, Natália e Camila, pela ajuda dada sempre quando precisei.

Ao professor Cristóforo Scavone e todos os colegas do laboratório de Farmacologia Molecular, Lídia, Paula, Ana Maria, Ana Elisa, Sabrina, Caio, Marina, Rosana e Andrea, pelo apoio, pelo suporte técnico e inúmeras reuniões científicas.

Às técnicas de laboratório, Guiomar, Larissa e Diana, pelo apoio e suporte técnico sempre disponível.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro concedido ao projeto e ao laboratório.

“Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador

Tem que passar além da dor.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Duque EA. Efeitos dos glicocorticoides na inflamação induzida por LPS em culturas primárias fronto-corticais de ratos neonatos. [Dissertação (mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

A resposta inflamatória exacerbada pode ser prejudicial, podendo levar à disfunção e dano tecidual, como acontece em patologias tais como na doença de Alzheimer e na esclerose múltipla. Embora os glicocorticoides (GCs) sejam os anti-inflamatórios mais prescritos mundialmente, foi demonstrado que níveis aumentados desse hormônio potencializam alguns aspectos da inflamação, por exemplo, a ativação do fator de transcrição NFKB induzida por lipopolissacarídeo (LPS). No encéfalo, o tipo celular onde a ativação deste fator ocorre é importante para predizer sua função, sendo a ativação neuronal considerada benéfica e a ativação glial, deletéria. Neste estudo avaliamos os efeitos dos GCs na ativação do NFKB induzida por LPS nos diferentes tipos celulares (neurônios, astrócitos e micróglia) em culturas primárias de córtex frontal derivadas de ratos Wistar neonatos. Culturas mistas de neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios foram previamente expostas à corticosterona (CORT 1 μM, 24 h), seguida de LPS (10 μg/mL, 1 h). Nossos resultados mostraram que as populações celulares em cada tipo de cultura foram 72% astrócitos, 22% microglia e 6% neurônios em culturas mistas; e 16% astrócitos, 8% microglia e 76% neurônios nas culturas enriquecidas. Microglia e neurônios expressaram o receptor TLR4 para o LPS enquanto os astrócitos foram negativos para essa proteína. Através de EMSA, verificamos que a CORT não exerceu sua atividade anti-inflamatória clássica nas células de cultura mista, uma vez que este hormônio não foi capaz de diminuir a ativação do NFKB induzida pelo LPS. Já nas culturas enriquecidas, não houve ativação de NFKB em nenhum dos tratamentos estudados. Analisando a subunidade RELA em cada tipo celular, observamos que neurônios não foram sensíveis ao LPS na ativação do NFKB e que nas microglias, este fator estava fortemente presente no núcleo após estímulo com LPS. Em nenhum dos tipos celulares foi observado efeito de CORT. Ao compararmos culturas mistas e enriquecidas, não houve diferença de resposta, sugerindo que nestas células, as interações celulares não são determinantes para a ativação do NFKB. Ainda, para os dois tipos celulares, observamos que a sinalização GR foi importante para a manutenção nuclear de RELA independente da presença de CORT ou LPS. Já os astrócitos se mostraram altamente responsivos ao LPS na ativação do NFKB, um efeito provavelmente indireto, já que essas células não expressaram o receptor TLR4. CORT não foi capaz de impedir a translocação nuclear de RELA, que foi atenuada na presença de RU486, um antagonista GR, revelando uma ação de CORT na manutenção do efeito induzido por LPS neste tipo celular. Ao compararmos os astrócitos de culturas mistas e enriquecidas, observamos que aqueles de culturas enriquecidas foram menos sensíveis ao LPS e que a sinalização via GR retomou o padrão observado em neurônios e micróglia desse tipo de cultura. Desta maneira, nossos resultados confirmam que CORT não é uniformemente anti-inflamatória e que a ação anti- ou pró-inflamatória deste hormônio é dependente do tipo celular e suas interações, da ativação de GR e da concentração dos GCs, sendo os astrócitos, nesse modelo, os principais alvos dessa ação seletiva.

Palavras-chave: Hormônios Glicocorticoides. Inflamação. Córtex Cerebral. Fatores de Transcrição. Astrócitos. Microglia

ABSTRACT

Duque EA. Glucocorticoids effects on LPS-induced inflammation in rat primary frontal cortex cultures. [dissertation (Masters thesis in Pharmacology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

The excessive inflammation can be detrimental and can lead to dysfunction and tissue damage, as seen in some diseases such as Alzheimer's and multiple sclerosis. Although glucocorticoids (GCs) are the most commonly worldwide prescribed anti-inflammatory drug, it was shown that increased levels of this hormone can enhance some aspects of inflammation, i.e., LPS (lipopolysaccharide)-induced NFKB activation. In the brain, the cell type where NFKB activation occurs could predict its function. Neuronal NFKB would be beneficial while glial NFKB would be deleterious. In this study we aimed to evaluate the effects of GCs on the LPS-induced NFKB activation at the different cell types (neurons, astrocytes, and microglia) of primary frontal cortex culture derived from newborn Wistar rats. Mixed neuron / glial cells cultures and enriched neurons cultures were previously exposed to corticosterone (CORT, 1 μM, 24h) followed by LPS (10 μg/ml, 1 h). The cell populations in each culture were 72% astrocytes, 22% microglia, and 6% neurons in mixed cultures and 16% astrocytes, 8% microglia, and 76% of neurons in enriched cultures. Neuron and microglia expressed TLR4, the LPS receptor, which was not observed for astrocytes. Using EMSA, we showed that CORT was not classically anti-inflammatory in mixed cultures, since this hormone did not prevent LPS-induced NFKB activation. In the neuronal enriched cultures, none of the treatments activated NFKB. For nuclear RELA localization, we observed that neurons were not responsive to LPS whereas microglia showed strong LPS-induced nuclear RELA imunnostaining. CORT did not modulate LPS-induced effects at neurons or microglia. Comparing mixed and neuronal-enriched cultures, there was no difference on NFKB activation, suggesting that for neurons and microglia, cell interactions was not determinant for this response. At these two cell types, GR signaling seemed important for the physiological maintenance of nuclear RELA, irrespective to CORT or LPS stimuli. Astrocytes from mixed cultures, on the other hand, were highly responsive to LPS-induced NFKB activation, probably to an indirect effect, since these cells were negative to TLR4. CORT did not prevent RELA nuclear translocation which was decreased by RU486, a GR antagonist, revealing a CORT role for the astrocyte maintenance of LPS-induced NFKB activation. Interestingly, astrocytes from neuronal-enriched cultures were less responsive to LPS and in the presence of RU486, they behave likewise neurons and microglia. Our results confirmed that CORT, indeed, is not uniformly anti-inflammatory and that the anti- or pro-inflammatory actions of CORT are dependent of cell type, cell interactions, GR activation, and GCs levels. Furthermore, we showed that astrocytes, in mixed cultures, are the main target for these selective GC roles.

Keywords: Glucocorticoids hormones. Inflammation. Cerebral Cortex. Transcriptional Factors. Astrocytes. Microglia

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µ. - micrograma

ANOVA - Análise de Variância

AP -1 - Proteína ativadora 1

AraC – Citosina Arabinosídeo

ATP - Trifosfato de Adenosina

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

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

CO_2 - Dióxido de Carbono

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CONT - Controle

CORT - Corticosterona

COX-2 - Ciclooxigenase -2

Cpm - Contagem por milhão

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

CX3CL1 - quimiocina ligante 1 da CX3C

CX3CR1 – Receptor de quimiocina ligante CX3C 1

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

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

DIV - Dia *in vitro*

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

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTT - Ditiotreito

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

GC - Glicocorticóides

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

GR - Receptor de Glicocorticóide

h - Hora

HEPES - acido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfonico (*4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid*)

HO-1 - Hemeoxigenase

HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

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

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

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-1β - Interleucina 1 β

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida

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

K^+ - Íon potássio

KCl - Cloreto de Potássio

KH_2PO_4 - Fosfato de Potássio mono-básico

L - litro

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

LPS - lipopolissacarídeo

M - Molar

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

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

$MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio

MilliQ - Água deionizada

mL - mililitro

MR - Receptor de Mineralocorticoides

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

Na_2HPO_4 - Fosfato de Sódio Dibásico

NaCl - Cloreto de Sódio

$NaHCO_3$ - Bicarbonato de Sódio

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

NFKB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NLRs - Receptores do tipo Nod

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*)

P1 - Pós-natal dia 1

p38 - P38 mitogen-activated protein kinases

P4 - Pós-natal dia 4

p65 - Subunidade RELA do Fator de Transcrição NFKB

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

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

PMSF - phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride- (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluo- ruro)

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

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

rpm - Rotações por minuto

RU38486 ou RU486 - Mifespristona ou *11β-(4-Dimethylamino)phenyl-17β-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

SNC - Sistema Nervoso Central

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

TGFβ – Fator de Transformação do Crescimento beta (Transforming Growth fator beta)

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 hydrochlorideTris*)

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

USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Cascatas Inflamatórias nas Doenças Neurodegenerativas 24

Figura 1.2 - Vias de Sinalização do NFKB 25

Figura 1.3 - Localização dos Receptores GR e MR no Cérebro de Ratos 27

Figura 1.4 - Estrutura do Receptor GR 29

Figura 1.5 - Via de Sinalização dos Glicocorticóides 30

Figura 1.6 - Vias de Sinalização do TLR4 31

Figura 3.1 - Esquema Experimental da Curva de Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS 36

Figura 3.2 - Esquema Experimental da Curva de Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS Após o Pré-tratamento com Corticosterona 36

Figura 3.3 - Esquema Experimental do Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS 37

Figura 3.4 - Esquema Experimental da Curva de Concentração Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS 38

Figura 3.5 - Esquema Experimental da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS 38

Figura 3.6 - Esquema representativo do padrão de contagem dos núcleos celulares 41

Figura 4.1 - Composição Celular das Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal 44

Figura 4.2 - Caracterização Imunocitoquímica das Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal 45

Figura 4.3 – Expressão dos receptores TLR4 em Microglia de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal. 46

Figura 4.4 – Expressão dos receptores TLR4 em Neurônios de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal. 47

Figura 4.5 – Expressão dos receptores TLR4 em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal. 48

Figura 4.6 – Curva de Concentração e Tempo-Resposta para o Efeito do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios 49

Figura 4.7 - Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona seguido do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia 50
Figura 4.8 - Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona seguido de LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Enriquecidas de Neurônios 51
Figura 4.9 - Efeitos do Tratamento Prévio com CORT seguido de LPS na Ativação do Fator de Transcrição NFKB em Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios 52
Figura 4.10 - Ensaio de Competição Específica e Inespecífica do Fator de Transcrição NFKB 52
Figura 4.11 - Efeitos de Diferentes Concentrações de CORT na Ativação do NFKB Induzida por LPS em Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia. 53
Figura 4.12 - Efeitos de Diferentes Concentrações de CORT na Ativação de NFKB Induzida por LPS em Culturas Enriquecidas de Neurônios. 55
Figura 4.13 - Efeitos da adição de RU486 ao tratamento prévio com CORT seguido de LPS na Ativação do Fator de Transcrição NFKB em Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios. 56
Figura 4.14 - Localização Nuclear da Subunidade do RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.....57
Figura 4.15 - Localização Nuclear da Subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mista de Neurônios /Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.....59
Figura 4.16 - Localização Nuclear da Subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mistas de Neurônios/ Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS. 60
Figura 4.17 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecidas de Neurônios. 61
Figura 4.18 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS. 62
Figura 4.19 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS. 63
Figura 4.20 - Comparação da localização nuclear de RELA em neurônios entre as culturas mistas e enriquecidas de neurônios. 64

Figura 4.21 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.....65
Figura 4.22 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.....66
Figura 4.23 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.....67
Figura 4.24 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecidas de Neurônios.....68
Figura 4.25 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.....69
Figura 4.26 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.....70
Figura 4.27 - Comparação da Localização Nuclear de RELA em Microglia entre as Culturas Mistas e Enriquecidas de Neurônios. 71
Figura 4.28 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.....72
Figura 4.29 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.....73
Figura 4.30 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.....74
Figura 4.31 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios.....75
Figura 4.32 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.....76
Figura 4.33 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486 seguido ou não por LPS. 77

Figura 4.34 - Comparação da localização nuclear de RELA em astrócitos entre as culturas mistas e enriquecidas de neurônios. 78
Figura 6.1 - Interações entre Astrócitos, Neurônios e Microglia 92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 OBJETIVOS 33

3 MATERIAIS E MÉTODOS 34

3.1 Animais 34

3.2 Culturas Primárias Mistas (Neurônios/Células da Glia) e Enriquecidas de Neurônios Fronto-Corticais 34

3.3 Tratamento das Culturas Primárias Corticais 35

3.3.1 Curva Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS 35

3.3.2 Curva Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS Após o Pré-tratamento com Corticosterona 36

3.3.3 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais 37

3.3.4 Curva de Concentração Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais 37

3.3.5 Efeitos da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais 38

3.4 Ensaio de Viabilidade (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay) 39

3.5 Imunofluorencência para a Subunidade RELA do NFKB e para o Receptor TLR4 39

3.6 Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel de Poliacrilamida (EMSA) 41

3.6.1 Extração das Proteínas Nucleares 41

3.6.2 Determinação da Concentração de Proteínas 42

3.6.3 Marcação da Sonda 42

3.6.4 Reação de Ligação e Corrida do gel 42

3.6.5 Revelação e Análise 43

3.7 Análise dos Resultados 43

4 RESULTADOS 44

4.1 Composição Celular de Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos 44

4.2 Caracterização dos Receptores TLR4 nas Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios 46

4.3 Curva de Concentração e Tempo-Resposta para o Efeito do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios 48

4.4 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona Seguido de LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios. 49

4.5 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais 51

4.6 Curva de Concentração-Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais. 53

4.7 Efeitos da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais 55

4.8 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona, na Presença ou Ausência de RU486, na Translocação Nuclear da Subunidade RELA do Fator de Transcrição NFKB em Culturas Primárias Corticais 56

***4.8.1 Neurônios* 57**

***4.8.2 Microglia* 64**

***4.8.3 Astrócitos* 71**

5 DISCUSSÃO 78

5.1 Caracterização da Cultura Primária 78

5.2 LPS, Glicocorticoides e Viabilidade Celular 81

5.3 LPS, Glicocorticoides e NFKB 84

5.4 NFKB e Tipos Celulares 86

6 CONCLUSÃO 92

REFERÊNCIAS 94

1 INTRODUÇÃO

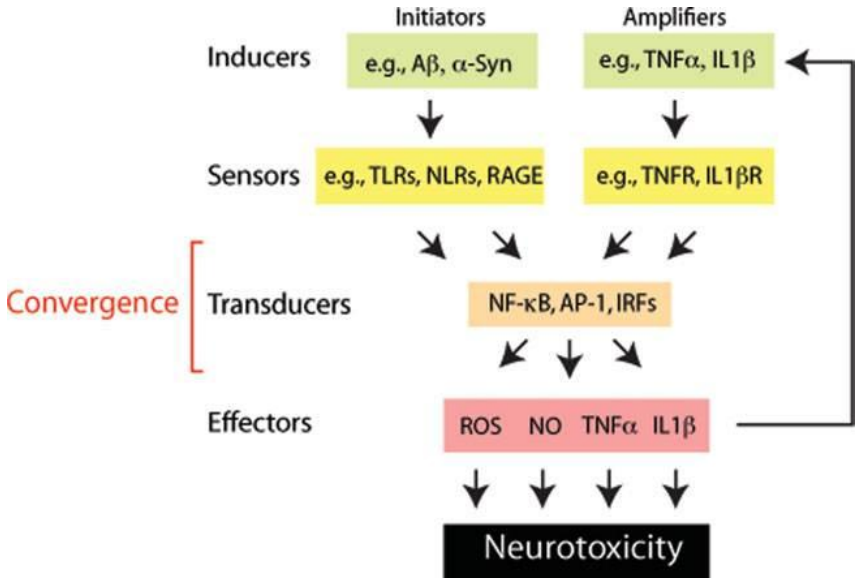
O sistema imune dos mamíferos tem como principal função a proteção do organismo contra agentes externos, e para isso, desencadeia respostas eficientes para combater a entrada de patógenos. A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa (Medzhitov, 2008; Palm *et al.*, 2009). A resposta imune inata é inespecífica, é a resposta inicial do organismo frente a um patógeno e, por si só, é capaz de eliminá-lo. Ainda, ela pode ativar a resposta imune adaptativa, mais específica, tornando-a eficiente contra diferentes tipos de patógenos (Medzhitov, 2010b). As células efetoras da imunidade inata, tais como neutrófilos e macrófagos na periferia (Medzhitov, 2008) e a microglia (Saijo *et al.*, 2011) no sistema nervoso central, expressam um limitado repertório de receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões, ou PRRs (*pathern-recognition receptors*) (Akira, 2011; Palm *et al.*, 2009) capazes de reconhecer partes de moléculas microbianas conservadas evolutivamente que são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Strowig *et al.*, 2012). Os receptores do tipo Toll (TLRs) são um exemplo de PRRs (Buchanan *et al.*, 2010). Os TLRs 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 (Jung *et al.*, 2005).

Uma vez ativado, o sistema imune inato inicia a resposta inflamatória que consiste na secreção de citocinas, quimiocinas, indução da expressão de moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias para o recrutamento de células do sistema imune ao sítio da infecção e para ativação da resposta imune adaptativa (Yang *et al.*, 2012). A resposta inflamatória aguda é necessária para eliminar o agente infeccioso e promover o reparo tecidual. Quando esta se torna excessiva ou crônica, ela pode ser prejudicial, podendo levar à disfunção e conseguinte dano tecidual (Medzhitov, 2010a). A inflamação crônica está fortemente associada a patologias como artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, asma, diabetes, aterosclerose, como também está relacionada às doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e esclerose múltipla (Glass *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

Existe uma grande controvérsia a respeito da função neuroprotetora e/ou neurotóxica da resposta imune inata no SNC desencadeada por processos inflamatórios (Floyd, 1999; Yoles *et al.*, 2001). Por exemplo, camundongos que superexpressam IL-6 e TNF-α (citocinas pró-inflamatórias) nas células da microglia apresentam convulsões e neurodegeneração (Akassoglou *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1993), porém, camundongos que não expressam receptores para TNF-α são mais suscetíveis a danos cerebrais produzidos por ácido caínico ou isquemia focal que o animal selvagem, sugerindo uma função neuroprotetora da sinalização por essa citocina (Gary *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2004).

Está bem definido que a maior parte dos processos neurodegenerativos é acompanhada por uma reação inflamatória (Floyd, 1999). Essa inflamação é caracterizada por infiltração de granulócitos e macrófagos/monócitos no parênquima cerebral, ativação da microglia, expansão de astrócitos, expressão de citocinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios (Dirnagl *et al.*, 1999; Feuerstein *et al.*, 1998). De fato, a exacerbação de respostas mediadas por células da microglia e astrócitos (gliose e astrogliose) pode ser encontrada nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington e também em pacientes portadores de Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2002). Além de secretarem citocinas, as microglias podem 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 (figura 1.1) (Allan *et al.*, 2001; Wyss-Coray *et al.*, 2002).

Figura 1.1 - Cascatas Inflamatórias nas Doenças Neurodegenerativas



Fonte: Saijo et al., 2013 (Saijo *et al.*, 2013)

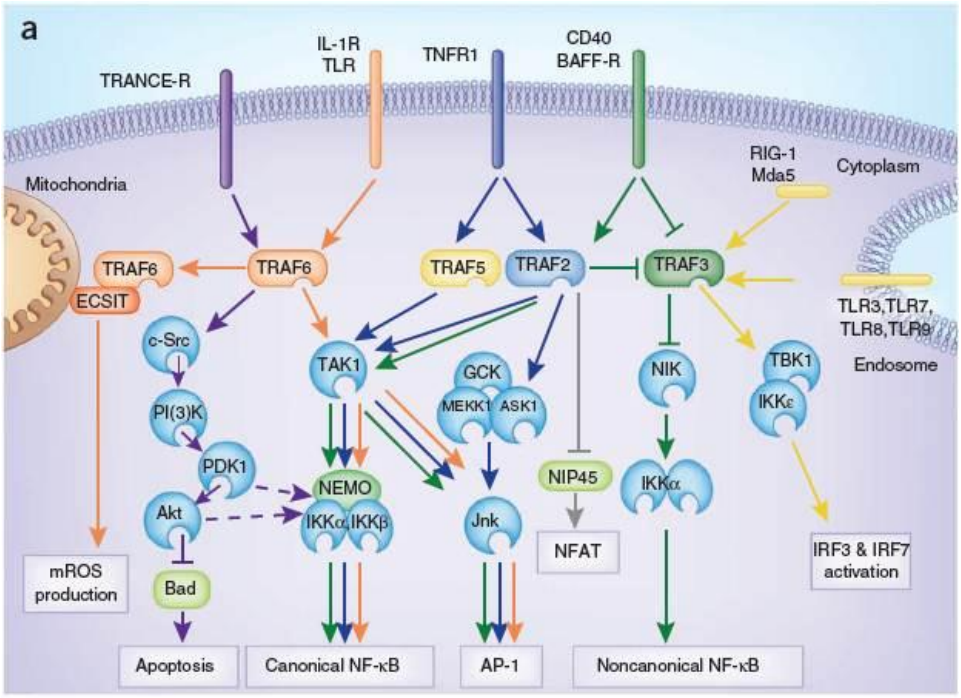
Vários tipos de estímulos podem ativar o fator de transcrição NFKB, tais como infecções virais, bacterianas, citocinas inflamatórias e o acoplamento antígeno-receptor, além de estímulos físicos, fisiológicos e estresse oxidativo (Camandola *et al.*, 2007). No SNC, as substâncias secretadas tanto pelas células da glia, quanto pelos neurônios, durante a resposta inflamatória, também ativam este fator (Nguyen *et al.*, 2002). Em mamíferos, cinco subunidades da família do NFKB foram identificadas, a saber: RELA ou p65, RELB e c-REL, e as proteínas precursoras NFKB1 (p105) e NFKB2 (p100), que são processadas a p50 e p52, respectivamente. Estas subunidades formam complexos transcricionais hetero- ou homodiméricos com atividades distintas. O heterodímero RELA/p50 representa a forma mais abundante do NFKB e é aquela normalmente ativada por LPS. Quando não estimulado, o NFKB encontra-se "sequestrado" no citoplasma pela proteína inibitória, o IκB (IκBα, IκBβ e IκBε) ou precursores de proteínas REL (p105 e p100) (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Após estimulação, a migração do dímero para o núcleo se dá depois da degradação do IκB, iniciada pela fosforilação desta proteína inibitória através, principalmente, do complexo IκB quinase (IKK). Este complexo é composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, e uma subunidade regulatória, denominada IKKγ ou NEMO (Modulador Essencial do NFKB). Proteínas IκB fosforiladas são alvo de ubiquitinação e degradação proteassomal, liberando os dímeros de NFKB para serem translocados para o núcleo e consequente ligação deste nos genes que apresentam a sequência regulatória 5'-

GGGACTTTCC - 3’ junto à região promotora. Desta forma, pode ocorrer a indução ou repressão da transcrição de genes alvo (Oeckinghaus *et al.*, 2011), dentre eles, os que codificam proteínas relacionadas à resposta inflamatória (citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema complemento, enzimas como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a forma induzível da Óxido Nítrico Sintase (iNOS), moléculas de adesão e receptores da resposta imune) (Ghosh *et al.*, 2002; Kaltschmidt *et al.*, 2002); além de outros genes relacionados à manutenção celular e plasticidade, tais como regulação da diferenciação celular, proliferação e sobrevivência (Camandola *et al.*, 2007).

De maneira geral, existem duas vias principais de ativação do NFKB, as vias canônica e não-canônica. A via canônica é induzida pela maioria dos estímulos fisiológicos do NFKB, como por exemplo, sinais dos receptores de citocinas como o receptor de TNF-α (TNFR), bem como de TLRs, como o TLR4, principal sinalizador do LPS. Esta via canônica é dependente de IKKβ e NEMO e leva principalmente à fosforilação do IκBα e translocação nuclear de heterodímeros de NFKB contendo RELA. Em contraste, a via não-canônica depende da fosforilação mediada por IKKα das proteínas precursoras p100 associadas a RELB que leva ao processamento parcial de p100 a complexos p52/RELB. Esta via não-canônica é induzida por uma sinalização específica da família do TNF, como o CD40, e também a lifotoxina-β (Oeckinghaus *et al.*, 2011), como ilustrado na figura 1.2.

Figura 1.2 - Vias de Sinalização do NFKB

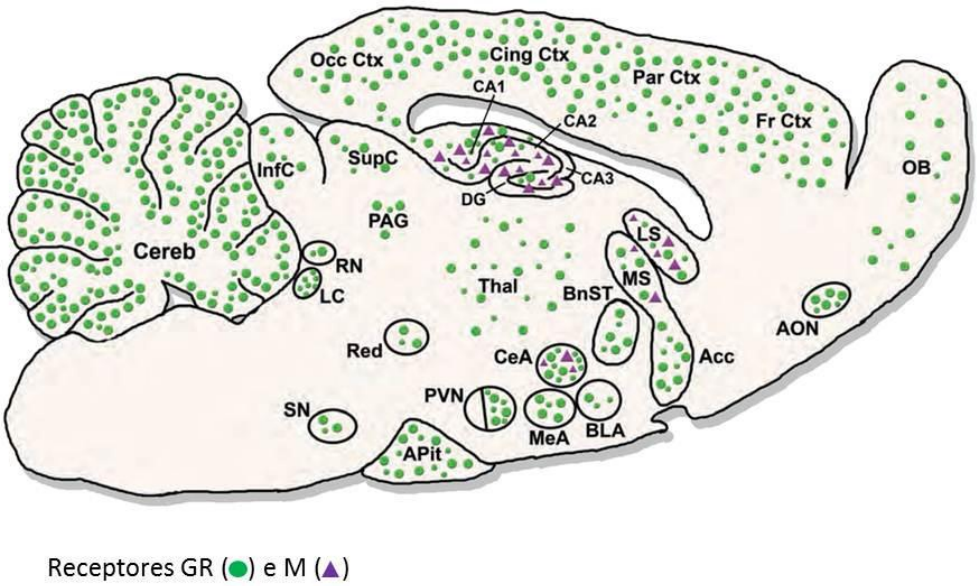


Fonte: Oeckinghaus et al., 2011 (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Dentre os fármacos anti-inflamatórios, os glicocorticóides (GCs) são os mais prescritos mundialmente, havendo uma grande variedade de derivados sintéticos disponíveis tais como a dexametasona e prednisolona (Schweingruber *et al.*, 2012). 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 (Schweingruber *et al.*, 2012), além de participarem de inúmeras funções fisiológicas, regulando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Busillo *et al.*, 2013), e também na resolução da inflamação (Medzhitov, 2010a).

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)(Medzhitov, 2010a). Os MR apresentam alta afinidade por GC e são de expressão mais restrita comparada aos GR (Gomez-Sanchez, 2010). No SNC, estão localizados nos sítios hipotalâmicos envolvidos no controle de sódio, no sistema límbico e no córtex pré-frontal (Joels *et al.*, 1994; McEown *et al.*, 2011). 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 (figura 1.3) (Joels *et al.*, 1994; McEwen *et al.*, 1986; Sierra *et al.*, 2008). 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 (de Kloet *et al.*, 2005; De Kloet *et al.*, 1998). A hipersecreção de GCs e o estresse estão relacionados com grande número de doenças neurológicas como depressão, demência, abuso de drogas e esquizofrenia (de Kloet *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2011).

Figura 1.3 - Localização dos Receptores GR e MR no Cérebro de Ratos



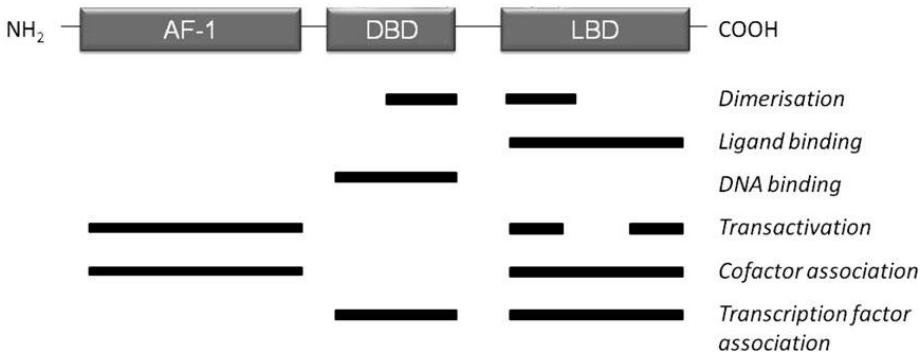
Representação da localização dos receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) no cérebro de ratos. Fonte: Kolber et al.,2008 (Kolber *et al.*, 2008).

Uma vez alcançado o tecido alvo, os GCs podem: 1) interagir com receptores GR de membrana, já descritos em humanos em linfócitos do tipo B e monócitos, sendo possivelmente uma variante do GR citoplasmático (Bartholome *et al.*, 2004), ou, 2) podem se ligar, no citoplasma, aos receptores pertencentes à superfamília de receptores nucleares, os GRs clássicos (Li *et al.*, 2011). 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 imunifilinas FKBP52 e Cyp40 (Schweingruber *et al.*, 2012). Este fato permite que o complexo GC-GR interaja com outras proteínas citosólicas, ou na maioria dos casos, permite sua translocação para o núcleo (Schweingruber *et al.*, 2012). 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 (Sabban *et al.*, 2001); a heme-oxigenase-1 (HO-1) e óxido nítrico sintase (NOS) (Weber *et al.*, 1994), enzimas responsáveis pela produção de monóxido de carbono e óxido nítrico, respectivamente; bem como alterando outros fatores de transcrição como CREB (Whitehead *et al.*, 1997), AP-1 (Karin *et al.*, 2001) e NFKB (Unlap *et al.*, 1997), estes dois últimos muito importantes na sinalização inflamatória.

A estrutura molecular do GR consiste em três domínios funcionais: 1) domínio amino N-terminal (NTD), que contém um dos principais domínios de transativação, denominado função de ativação 1 (AF1). Este domínio é funcionalmente importante, uma vez que é necessário para atividade transcricional dos hormônios esteroides e para várias respostas célula e gene-específicas; 2) domínio de ligação ao DNA (DBD), que se liga ao elemento responsivo a glicocorticoides na região promotora de genes alvos; e 3) domínio de ligação ao ligante (LBD) que contém o domínio de ligação aos glicocorticoides, bem como sequências importantes para interação com co-reguladores, sejam eles co-ativadores e/ou co-repressores (Oakley *et al.*, 2011). Por exemplo, estudos de cristalografia na região LBD com RU38486 (ou somente RU486), ou Mifepristona, antagonista dos GR, mostrou que a ligação de RU486 com a região LBD induz uma mudança conformacional que altera a posição das sequências co-ativadoras, prevenindo a interação com moléculas coativadoras e favorecendo a ligação com moléculas co-repressoras, levando ao antagonismo (Allaman *et al.*, 2011; Kauppi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009).

Duas isoformas humanas do GR já foram identificadas, o GRα e o GRβ, que são originadas por *splicing* alternativo do transcrito primário de GR. O GRα é a isoforma predominante do receptor e é aquela que se liga aos GCs e transduz seu sinal (Oakley *et al.*, 2011). A distinção entre a estrutura e funcionalidade dessas isoformas apenas foi possível recentemente com a disponibilidade de anticorpos seletivos para cada uma delas. O GRβ difere do GRα na sequência carboxi-terminal, onde os 50 últimos aminoácidos foram substituídos por uma sequência de 15 aminoácidos não-homólogos, tornando o GRβ não responsivo aos GCs (figura 1.4) (Ligr *et al.*, 2012; Oakley *et al.*, 2011). Desta maneira, não há ativação ou transcrição dos genes alvos pelos GCs quando ligados ao GRβ. A literatura relata que o GRα sofre uma inibição por GRβ, por um mecanismo que envolve a formação de heterodímeros GRα-GRβ (Oakley *et al.*, 2011). Entretanto, em estudo recente, Lewis-Tuffin et al., (2007) relataram, em cultura de linhagem de células U2OS (provenientes de osteosarcoma humano) e COS-1 (fibroblastos renais provenientes de macacos verdes africanos), que o RU486 se liga ao GRβ, e que este receptor é transcricionalmente ativo (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007). O GRβ foi descrito em algumas células, especialmente em células inflamatórias tais como linfócitos e macrófagos, em doenças relacionadas com resistência aos GCs, como asma (Sousa *et al.*, 2000) e leucemia linfocítica crônica (Shahidi *et al.*, 1999). Sua significância fisiológica ainda é desconhecida (revisado (Smoak *et al.*, 2004)).

Figura 1.4 - Estrutura do Receptor GR



Representação dos três domínios do receptor GR. Domínio amino N-terminal com a função de ativação 1 (AF1), domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio de ligação ao ligante (LBD) e as principais funções de cada domínio. Fonte: Modificado de Nixon et al., 2013 (Nixon *et al.*, 2013).

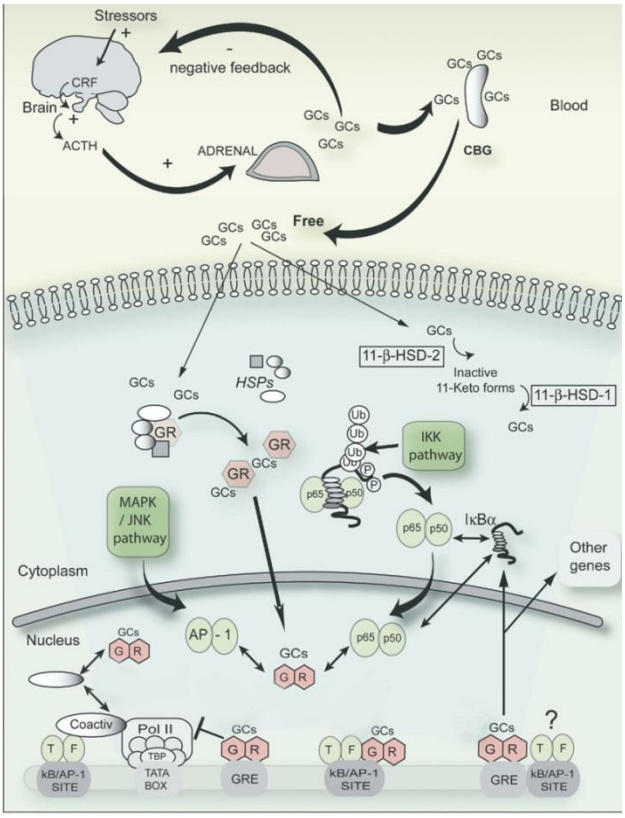
Outras isoformas de GR já foram identificadas, como os GRγ, GR-A e GR-P, cuja expressão foi observada em várias células e tecidos relacionados com a resistência aos glicocorticoides e em células neoplásicas. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre as suas respectivas funções fisiológicas (revisado em (Allaman *et al.*, 2011)).

Além destas isoformas já conhecidas, recentemente foram demonstradas mais oito isoformas de GR derivadas por início alternativo da tradução do mRNA para o GRα, com NTDs progressivamente mais curtos (Oakley *et al.*, 2011). Cada isoforma possui características especiais, por exemplo, a isoforma GRα-D está constitutivamente no núcleo e está ligada a certas regiões promotoras GRE. E também são diferentes quanto aos genes que regulam, sendo o GRα-C a isoforma mais ativa transcricionalmente (Oakley *et al.*, 2011). É possível que cada isoforma de *splicing* alternativo possua também isoformas de início alternativo da tradução do RNA mensageiro, aumentando ainda mais o leque de interações moleculares possíveis, genes regulados e consequentes efeitos biológicos desses hormônios.

Tendo em vista todas essas isoformas, podemos concluir que a regulação da transcrição gênica pelos GCs é complexa. A sequência do sítio de ligação ao DNA tem influência na conformação dos GR-GC, o que leva a diferentes padrões de expressão gênica. Além disso, o recrutamento dos GR-GC e seus elementos regulatórios, como co-ativadores e RNA polimerase II, para ligação ao DNA são também dependentes do padrão preexistente de cromatina acessível, que parece ser tipo celular específico. Ainda, existem modificações pós-translacionais dos GR-GC como acetilação e fosforilação que influenciam na força de ligação do complexo ao DNA, impactando na transcrição e seleção dos genes regulados por este complexo (ver (John *et al.*, 2011; Meijsing *et al.*, 2009)).

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 NFKB (figura 1.5) (Pruett *et al.*, 2003; Unlap *et al.*, 1997). É bem estabelecido que os GCs aumentam a transcrição da proteína inibitória IκBα (Quan *et al.*, 2000; Unlap *et al.*, 1997), mantendo o NFKB na sua forma inativa no citoplasma e impedindo sua translocação para o núcleo. Além disso, uma interação direta entre o complexo GC-GR e a subunidade RELA que compõe o NFKB impediria a ligação deste fator à sequência consenso no DNA, diminuindo a transcrição dos genes alvos (De Bosscher *et al.*, 2003). Um terceiro mecanismo seria uma competição entre o complexo GC-GR e o NFKB por proteínas co-ativadoras como, por exemplo, a proteína ligante ao CREB (CBP), impedindo a ação desses fatores em modular a transcrição dos genes alvos (McKay *et al.*, 2000). 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 (Tolosa *et al.*, 1999), modular a expressão de citocinas (Cato *et al.*, 1996), inibir a migração de células inflamatórias (Cronstein *et al.*, 1992; Getting *et al.*, 1997) e também inibir a transcrição de importantes genes pró-inflamatórios através da interação com o fator de transcrição AP-1, além do NFKB (De Bosscher *et al.*, 2000).

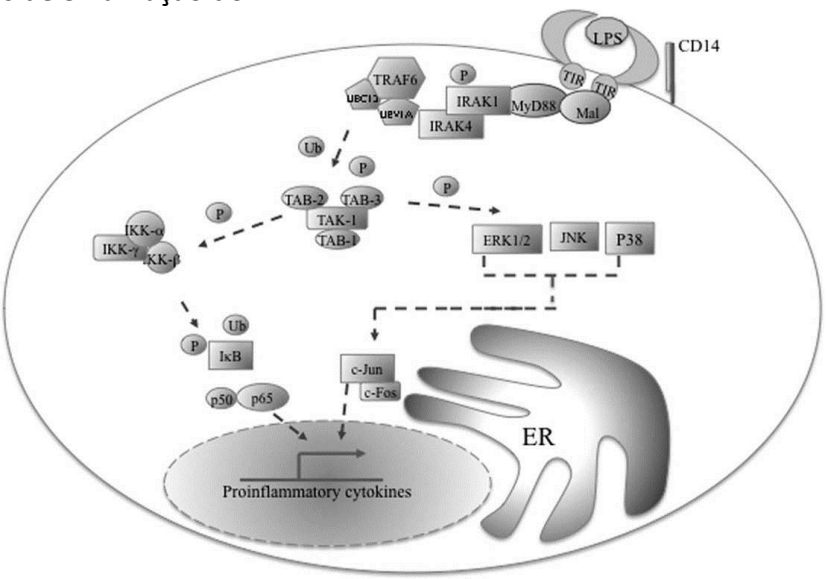
Figura 1.5 - Via de Sinalização dos Glicocorticóides



Representação das vias de sinalização dos GCs. Fonte: Modificado de Glezer et al., 2007 (Glezer *et al.*, 2007)

O modelo de inflamação aguda utilizado neste projeto é baseado na resposta inflamatória desencadeada pelo LPS. Este inicialmente se liga a fatores solúveis, como a proteína-ligante de LPS, e em seguida, é transferido às células alvo como os macrófagos na periferia e a microglia no SNC. Tanto macrófagos (Akira, 2011), como a microglia (Saijo *et al.*, 2011), expressam uma molécula de superfície chamada CD14, que captura e retém o LPS. Esta por sua vez, ativa o receptor TLR4. Uma pequena molécula secretada, MD2, está associada ao TLR4 e é crítica na formação do complexo de reconhecimento ao LPS. De maneira geral, com exceção do TLR3, a ativação dos TLRs, assim como do TLR4, leva ao recrutamento da proteína MyD88 e subsequente ativação da transcrição gênica de mediadores inflamatórios induzidos pelas vias do NFKB e das MAP quinases (Akira, 2011; Hanamsagar *et al.*, 2012). Exemplos destes mediadores são os precursores da citocinas IL-1β e IL-18 (pró-IL-1β e pró-IL-18), importantes na sinalização inflamatória (figura 1.6) (Hanamsagar *et al.*, 2012).

Figura 1.6 - Vias de Sinalização do TLR4



Esquema representativo das vias de sinalização do TLR4. Fonte: Avila et al, 2011 (Avila *et al.*, 2011)

A ativação dos inflamassomas, complexo formados por NLRs, ou receptores do tipo Nod, entre outras proténas (CARD e ASC), responsável pela conversão da pró-IL-1β e pró-IL-18, em IL-1β e IL-18 respectivamente, pela ação da caspase-1 (Hanamsagar *et al.*, 2012), é reconhecida como sendo crítica para a resposta do hospedeiro aos patógenos e DAMPs. E mais ainda, os papéis dos inflamassomas se estendem a carcinogênese, doenças autoimunes e síndromes metabólicas (Henao-Mejia *et al.*, 2012). Um estudo recente mostra que os GCs aumentam tanto a expressão quanto a função do receptor NRLP3, em cultura primária e

linhagem de macrófagos estimulados com ATP, além de aumentar a liberação de mediadores pró-inflamatórios induzidos pelo ATP, como IL-1β, TNF-α e IL-6, efeitos estes dependentes da presença dos GRs (Busillo *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem um possível mecanismo pelo qual os GCs agem como moduladores positivos da resposta inflamatória.

De fato, são cada vez mais comuns trabalhos 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 (Sorrells *et al.*, 2009)]. Alguns resultados de nosso laboratório mostram que o período de 14 dias de estresse crônico imprevisível potencializa a ativação do NFKB induzida por LPS, bem como a expressão de genes pró-inflamatórios (*iNos, il-1β, Tnf-α*) no córtex frontal e hipocampo, porém não no hipotálamo ou coração de ratos. Foi mostrado também que essa potencialização ocorreu via ativação dos receptores GR, uma vez que o pré-tratamento com RU486, a reverteu (Munhoz *et al.*, 2006).

Em estudos posteriores, foram confirmados os efeitos pró-inflamatórios dos GCs usando um modelo diferente de manipulação dos níveis desses hormônios no organismo de ratos, mostrando que essa ação é dependente da dose dos GCs, da cronicidade da exposição e da estrutura analisada. Utilizando ratos adrenalectomizados que receberam implante subcutâneo de *pellets* com concentrações crescentes de corticosterona (CORT, 15%, 30% e 100%)[1] 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, e que esse efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação da via das proteínas MAP kinase (ERK 1/2, JNK/SAPK e p38) (Munhoz *et al.*, 2010).

Ainda, resultados obtidos pelo grupo do Dr. Sapolsky (Dinkel *et al.*, 2003) mostraram que altos níveis de GCs (28 μg/dL) aumentam tanto o tamanho da lesão neuronal em hipocampo de ratos, causada por ácido caínico, como o número de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e microglia) e a expressão de citocinas (TNF-α, IL-1α e IL-1β) nessa região. É interessante notar que tanto resultados de nosso laboratório, quanto àqueles obtidos pelo grupo do Dr. Sapolsky, sugerem que esses efeitos pró-inflamatórios/deletérios dos GCs não são gerais, e que, em situações e estruturas diferentes, esses hormônios ainda

[1] 15% CORT geram níveis basais de GCs (aproximadamente 6 ug/dl); 30% e 60% CORT geram níveis de GCs encontrados em situações de estresse moderado (entre 20 e 28 ug/dl) e 100% CORT geram níveis de GCs encontrados em situações de estresse severo (maiores que 30 ug/dl).

apresentam sua tradicional ação anti-inflamatória, como observado através do tratamento com RU486, o qual causou aumento na ativação do NFKB, tanto no cérebro (córtex, hipotálamo e hipocampo), quanto na periferia (coração) de ratos não estressados tratados com LPS. Ainda efeito similar também foi observado no hipotálamo e coração dos ratos estressados e tratados com LPS (Munhoz *et al.*, 2006).

Levando em consideração os vários estudos descritos acima, verificamos em um modelo *in vitro* caracterizado em nosso laboratório, os efeitos mediados por GCs na inflamação aguda induzida por LPS. Utilizamos culturas mistas de neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios, derivadas do córtex frontal de ratos Wistar neonatos, para verificar a ativação do fator de transcrição NFKB. Além disso, avaliamos a possível participação das diferentes concentrações celulares nestes modelos (astrócitos, microglia e neurônios) envolvidos nesta resposta.

2 OBJETIVOS

Neste estudo visamos avaliar os efeitos dos glicocorticoides em alguns aspectos da resposta inflamatória induzida por LPS nas diferentes populações de células (neurônio, microglia e astrócitos) primárias de córtex frontal derivadas de ratos Wistar neonatos.

Para tanto, avaliamos:

- o padrão de ativação do fator de transcrição NFKB através do ensaio de EMSA nas células em cultura na presença ou na ausência do pré-tratamento com corticosterona seguido ou não da exposição ao LPS;
- a localização desta resposta, se em neurônios ou em células da glia, através de ensaios de imunofluorescência de dupla marcação nas células em cultura na presença ou na ausência do pré-tratamento com corticosterona seguido ou não da exposição ao LPS;
- o envolvimento dos GR através da utilização do antagonista RU486 ou Mifepristona, nas situações acima descritas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, entre 1 e 4 dias de idade (P1-P4) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os procedimentos experimentais seguiram todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de São Paulo e estão registrados sob o número 132 (certificado em anexo).

3.2 Culturas Primárias Mistas (Neurônios/Células da Glia) e Enriquecidas de Neurônios Fronto-Corticais

As culturas primárias de tecido cortical foram preparadas a partir do protocolo descrito por Ahlemeyer & Baumgart-Vogt (Ahlemeyer *et al.*, 2005), com algumas modificações. Os animais foram sacrificados por decapitação e em seguida foi realizada a dissecção do encéfalo e dissecção do córtex frontal em meio de dissecção 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, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), em pH 7,4. O córtex frontal isolado foi mantido por cerca de 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) a 0,05% e DNAse a 0,001% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) em tampão Hanks, 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), 10% de soro de cavalo (SC, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich) 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 em placas de cultura multipoços cobertas por poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich) 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 Tripan (Sigma-Aldrich) (Strober, 2001).

Culturas mistas de neurônios/células gliais foram mantidas em DMEM suplementado com antibióticos, 10% SFB e 10% SC. Para manutenção deste tipo de cultura, o meio foi trocado por meio fresco no 2º e 5º dias. Para as culturas enriquecidas de neurônios, após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM suplementado com antibióticos, 2 mM de glutamina e 2% de suplemento B27 (Life Technologies), suplementação específica que favorece crescimento neuronal (Velasco *et al.*, 2003). Para manutenção deste fenótipo, no quinto dia *in vitro* (DIV), o meio foi substituído por meio fresco (DMEM + antibióticos + 2% B27). No 8º DIV, ambos os fenótipos de cultura foram submetidos aos nossos protocolos de tratamento descritos a seguir.

3.3 Tratamento das Culturas Primárias Corticais

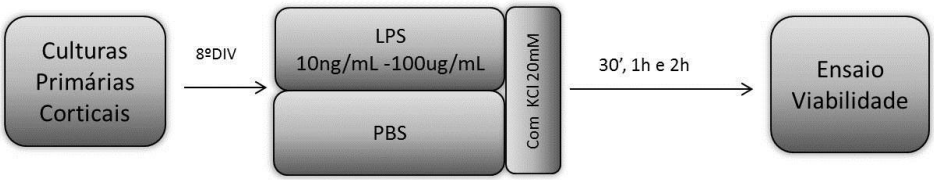
3.3.1 Curva Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS

Para verificar qual a concentração e o tempo do desafio inflamatório com LPS a ser utilizada, foi feita uma curva de concentração e tempo-resposta. Em todas as concentrações e tempos, culturas celulares foram plaqueadas em uma densidade de 1,0 x 10^5 células/poço em placas 24-poços recobertas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma).

No 8º DIV, imediatamente antes de cada tratamento, uma solução de LPS 1 mg/mL (Escherichia coli 0111:B4; Sigma-Aldrich) foi diluída em meio de cultura apropriado ao modelo (DMEM + 2% SFB + 2% SC para as culturas mistas e DMEM + 2% B27 para as culturas enriquecidas) para concentrações correspondentes de 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Em cada preparação, foi adicionado 20 mM de cloreto de potássio (KCl) para aumentar a toxicidade do LPS (Chang *et al.*, 2000; Lehnardt *et al.*, 2003), e este foi mantido por 30 minutos, 1 e 2 horas. Grupos controle foram mantidos do mesmo modo, com adição de solução salina balanceada (PBS, veículo: 135 mM de NaCl, 1,3 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 e 3,2 mM de Na_2HPO_4) e também com adição de 20 mM de KCl. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio fresco sem LPS e as células foram submetidas ao teste de viabilidade avaliada pelo kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega,Madison,

WI, EUA) (figura 4.1). Para este experimento, foram utilizadas de 6 a 8 culturas independentes em, no mínimo, quadruplicata para cada tratamento.

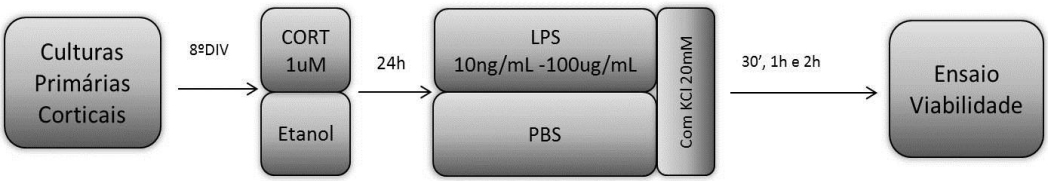
Figura 3.1 - Esquema Experimental da Curva de Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS



3.3.2 Curva Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS Após o Pré-tratamento com Corticosterona

Para verificar os possíveis efeitos do pré-tratamento com corticosterona (CORT) sobre a curva de concentração resposta ao LPS, culturas primárias corticais mistas ou enriquecidas foram realizadas como descrito no item anterior. No 8º DIV, as células foram pré-tratadas com veículo (1% etanol) (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) ou CORT (Sigma) 1 µM por 24 horas em meio apropriado ao modelo. Em seguida, o meio foi removido e as células foram mantidas em meio de cultura adicionado ou não de veículo (PBS) ou LPS, adicionados de 20 mM de KCl, nas mesmas concentrações e nos mesmos tempos mencionados no item anterior. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura fresco sem LPS e 20 mM de KCl e as células foram submetidas ao teste de viabilidade avaliada pelo kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) (figura 3.2). Para este experimento, foram utilizadas de 8 culturas independentes em, no mínimo quadruplicata para cada tratamento.

Figura 3.2 - Esquema Experimental da Curva de Concentração e Tempo Resposta dos Possíveis Efeitos de LPS Após o Pré-tratamento com Corticosterona

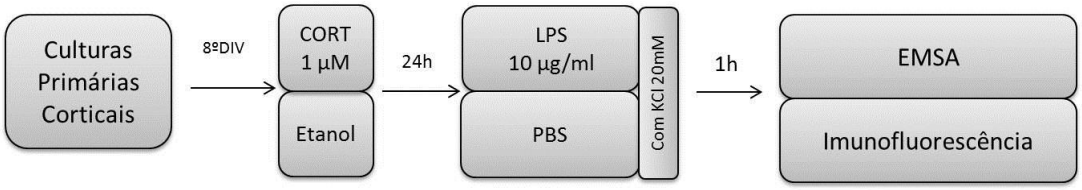


3.3.3 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

Para verificar os efeitos do tratamento prévio com CORT na ativação do fator de transcrição NFKB induzida pelo LPS, as culturas celulares foram plaqueadas em uma densidade de 1,0 x 10^6 células/poço em placas 6-poços recobertas com poli-L-lisina 0,01%. No 8º DIV, as células foram pré-tratadas com veículo (1% etanol) ou CORT 1 µM por 24 horas em meio apropriado. Em seguida, o meio foi removido e as células foram mantidas, em meio de cultura apropriado para cada modelo, adicionados do veículo (PBS) ou LPS 10 µg/mL, adicionado 20 mM de KCl, por 1 hora. Grupos controle foram tratados do mesmo modo, com adição de PBS e também com adição de 20 mM de KCl (figura 3.3). Para este experimento, foram utilizadas 8 culturas provenientes de neonatos de diferentes ninhadas, nos quais dois poços/placa formaram uma amostra para cada tratamento.

Para os ensaios de imunofluorescência, lotes diferentes de células foram utilizados e as células foram tratadas do mesmo modo que descrito acima. Para estes experimentos, foram utilizadas 3 culturas independentes, em triplicata para cada tratamento (figura 3.3).

Figura 3.3 - Esquema Experimental do Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS

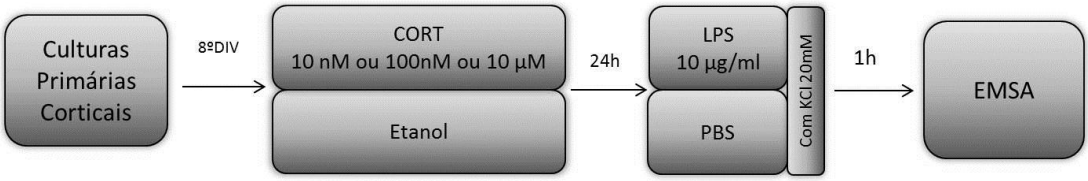


3.3.4 Curva de Concentração Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

Para verificar os efeitos de diferentes concentrações de CORT sobre a ativação do fator de transcrição NFKB induzidos pelo LPS, as células foram pré-tratadas com concentrações crescentes de CORT. De igual modo ao item anterior, as culturas celulares foram plaqueadas em uma densidade de 1,0 x 10^6 células/poço em placas 6-poços recobertas com poli-L-lisina 0,01%. No 8º DIV, as células foram pré-tratadas com veículo (1% etanol) ou CORT 10 nM, 100 nM ou 10 µM por 24 horas em meio apropriado a cada modelo. Em seguida, o meio foi removido e as células foram mantidas em meio de cultura apropriado adicionado de veículo (PBS) ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, adicionados de 20 mM de KCl

(figura 3.4). Para este experimento, foram utilizadas 5 culturas independentes, nos quais dois poços/placa formaram uma amostra para cada tratamento.

Figura 3.4 - Esquema Experimental da Curva de Concentração Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS

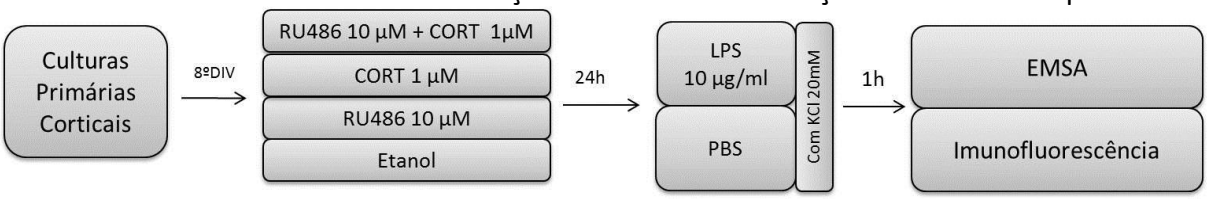


3.3.5 Efeitos da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

Para verificar os efeitos da adição do antagonista de receptores GR ao pré-tratamento com corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em ambos os modelos de cultura, as células foram plaqueadas de igual modo aos itens anteriores. No 8º DIV, as células foram pré-tratadas com veículo (1% etanol) ou CORT 1 µM por 24 horas, na presença ou ausência de RU486 (Mifepristona ≥ 98%, Sigma-Aldrich) 10 µM em meio apropriado a cada modelo. Em seguida, o meio foi removido e as células foram tratadas com meio de cultura apropriado adicionado ou não de veículo (PBS) ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, adicionados de 20 mM de KCl (figura 3.5) . Para este experimento, foram utilizadas 3 a 4 culturas independentes, nos quais dois poços/placa formaram uma amostra para cada tratamento.

Para os ensaios de imunofluorescência, lotes diferentes de células foram utilizados e as células foram tratadas do mesmo modo descrito acima. Para estes experimentos, foram utilizadas 3 culturas independentes, em triplicata para cada tratamento (figura 3.5).

Figura 3.5 - Esquema Experimental da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS



3.4 Ensaio de Viabilidade (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay)

A viabilidade celular após os tratamentos com LPS e Corticosterona seguido de LPS foi avaliada pela atividade metabólica das células em cultura medida pelo kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Esse é um ensaio de fluorescência que permite mensurar o número de células mortas em uma população de células. Este kit utiliza o indicador corante resazurina para medir a capacidade metabólica das células, provavelmente através da mensuração do metabolismo aeróbio celular (O'Brien *et al.*, 2000) – um indicador de viabilidade celular. As células viáveis retêm a habilidade de reduzir resazurina para resorufina, que é altamente fluorescente, enquanto que, as células não viáveis, perdem esta função. Para cada poço de uma placa de 24 poços ou 48 poços, o reagente foi adicionado para uma concentração final de 10%, em meio de cultura sem LPS ou KCl como descrito anteriormente. A leitura da fluorescência foi realizada 2,5 horas após adição do mesmo. Para leitura e análise de fluorescência, foi utilizado o equipamento *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* (BioTek, Winooski, VT, USA). A viabilidade celular foi calculada como percentagem dos poços-controles e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A diminuição na viabilidade celular, em nosso modelo experimental, foi interpretada como morte celular.

3.5 Imunofluorencência para a Subunidade RELA do NFKB e para o Receptor TLR4

Para os ensaios de imunofluorencência, as células (1×10^4 célula/poço) foram plaqueadas em lamínulas de boro-silicato recobertas com poli-L-lisina e mantidas em meio apropriado para cada modelo celular. O método utilizado foi baseado no método descrito por Piccioli et al., (Piccioli *et al.*, 2001) com modificações.

Após os tratamentos anteriormente descritos (figuras 3.3 e 3.5), 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 por 5 minutos, e novamente lavadas com PBS. A seguir, as células foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de jumento + 0,05% Triton X-100 em PBS) (Sigma-Aldrich) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo primário (MAP2, GFAP, lectina-FITC, IBA, anti-RELA ou anti-

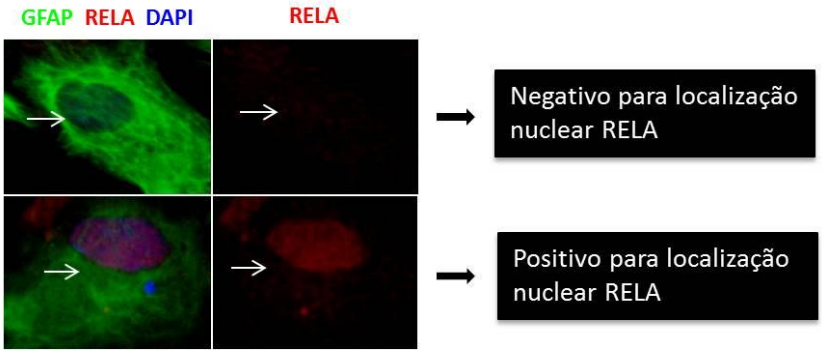
TLR4) diluído em soro de bloqueio e deixadas overnight a 4 °C ao abrigo da luz. A seguir, as células foram lavadas com PBS (3 vezes por 10 minutos com PBS) e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com anticorpo secundário (AlexaFluor 594; AlexaFluor 488; 1:2.000, Invitrogen) diluído em PBS + 0,05% Triton X-100, exceto para as células incubadas com lectina-FITC. Finalmente, as lamínulas contendo as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com DAPI (Sigma-Aldrich) (1:100.000, diluído em PBS + 0,05% Triton X-100), lavadas novamente com PBS, montadas em lâmina com Fluoromount-G (Southern Biotech, PA, EUA) e seladas com esmalte, ou com PVA -Dabco (Sigma-Aldrich).

Os neurônios corticais frontais foram marcados com o anticorpo contra proteína associada à microtúbulos 2 (anti-MAP2, 1:1000, Sigma-Aldrich). Os astrócitos foram marcados contra GFAP, uma proteína do filamento intermediário, restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP (1:1000, Sigma-Aldrich). A microglia foi marcada com lectina de tomate (Lectina de *Lycopersicon esculentum* (tomate)-FITC conjugada, 1:1500, Sigma-Aldrich) ou com o anticorpo anti-IBA1 (1:1000, Sigma-Aldrich). Ainda, foi utilizado anticorpo específico para o subunidade proteica RELA (p65) do fator de transcrição NFKB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e também para o receptor Toll-like 4 (1:500,Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). No último caso, somente grupos controle foram submetidos ao ensaio de imunofluorência para TLR4.

As células 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). Foram fotografados com aumento de 40X dez campos visuais por lamínula (no total de trinta fotos), escolhidos ao acaso, para cada tratamento de três culturas diferentes. As células foram contadas com o auxílio do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, EUA).

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

Figura 3.6 - 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.

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

Para os ensaios de EMSA, as células (1 x 10^6 células/poço), após os tratamentos, foram coletadas em PBS (solução salina balanceada) gelado acrescido de inibidores de proteases e fosfatases (2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 3 mM pirofosfato de sódio; 3 mM fluoreto de sódio e 5 mM β-glicerofosfato) (Sigma-Aldrich) e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi armazenado a -80 °C para posterior lise e extração nuclear.

3.6.1 Extração das Proteínas Nucleares

O pellet de células foi ressuspendido em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl; 2,5 µg/mL leupeptina; 2,5 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 3 mM pirofosfato de sódio; 3 mM fluoreto de sódio, 5 mM β-glicerofosfato, 0,1 mM EDTA e água) (Sigma-Aldrich) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida 10 µL de NP-40 (Sigma-Aldrich) a 5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13.000 xg 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 ressuspendido em tampão de extração nuclear (20 mM HEPES; 1,5 mM $MgCl_2$; 300 mM NaCl; 2,5 µg/mL leupeptina; 2,5 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 20 mM pirofosfato de sódio; 30 mM fluoreto de sódio, 5 mM β-glicerofosfato, 0,25 mM EDTA, 25% glicerol e água) (Labsynth;Sigma-Aldrich) e incubado com

agitação por 20 minutos em gelo, centrifugando-se a 13.000 xg por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, contendo a fração nuclear, foi coletado em outro tubo e armazenado em -80 °C para posterior dosagem de proteína.

3.6.2 Determinação da Concentração de Proteínas

A dosagem foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando reagente da 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). A comparação com uma curva padrão de albumina (Bio-Rad Laboratories) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.6.3 Marcação da Sonda

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 oligonucletídeo, 1 U/µL de T4 quinase, 1 µL de γ-32P-ATP (3 Ci/mmol), 1 µL de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 µL 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/µL.

3.6.4 Reação de Ligação e Corrida do gel

A um tubo de microcentrífuga foram adicionados: 4 µL 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 µg/µL; glicerol 20%) (Sigma-Aldrich); extrato nuclear em quantidade suficiente para 2 µg de proteína para as culturas mistas e 6 µg de proteína para as culturas enriquecidas, 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 µL 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 µL 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 aproximadamente 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-Aldrich). Ao final da corrida, o gel foi secado à vácuo em 80 °C por aproximadamente 2h e exposto ao filme radiográfico (RX-A, IBF – Medix, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A exposição ocorreu por 2 a 7 dias, mistas e enriquecidas, respectivamente, a -80 °C.

Para os ensaios de competição específica ou inespecífica, o extrato nuclear foi incubado com excesso de oligonucleotídeo não-marcado, 20 minutos antes da adição do oligonucleotídeo marcado. Para a competição específica foi utilizada a mesma seqüência do oligonucleotídeo marcado 10 vezes em excesso. Para a competição inespecífica foi utilizada a seqüência para o fator de transcrição TFIID (5’ – GCA GAG CAT ATA AGG TGA GGT AGG A – 3’) 10 vezes em excesso.

3.6.5 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* (Image Processing and Analysis in Java). Os dados de densidade óptica foram normalizados como percentagem dos grupos controles e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

3.7 Análise dos Resultados

As diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controles foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de um critério seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls , e

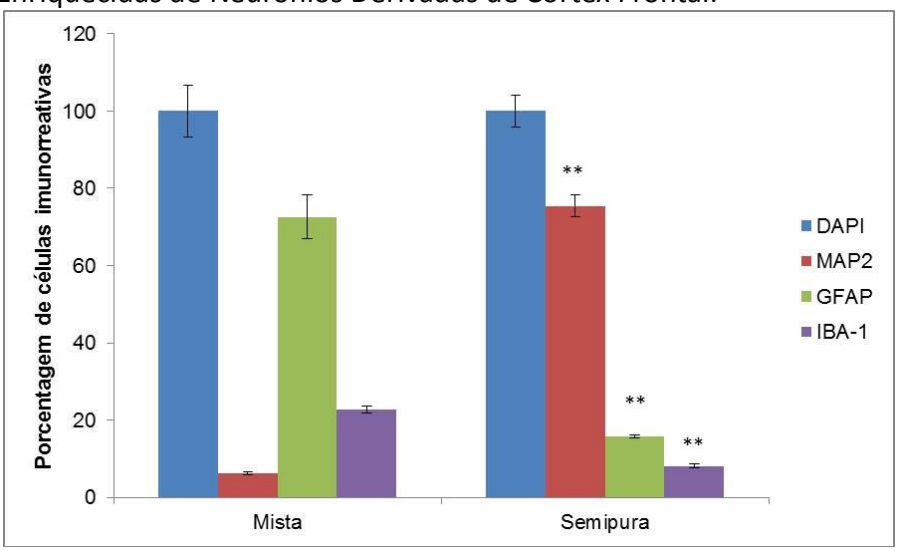
de dois critérios (Mista X Enriquecida) seguidos pelo pós-teste de Bonferroni para as comparações entre os modelos de cultura nos ensaios de imunofluorescência. Valores para $p < 0.05$ foram adotados como estatisticamente significativos. Ainda, utilizamos a estatística descritiva para obtenção de médias e erro padrão da média. Todas as análises foram realizadas no programa *GraphPad Prism* para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

4.1 Composição Celular de Culturas Primárias Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal de Ratos Neonatos

Utilizando protocolo descrito anteriormente, as culturas mistas neurônios/células da glia derivadas de córtex frontal foram compostas por 6,2 ± 0,44% de neurônios; 22,65 ± 0,91% de microglia e 72,6 ± 5,63% de astrócitos. Para as culturas denominadas enriquecidas de neurônios, a população celular foi composta por 75,47 ± 2,79% de neurônios; 8,04 ± 0,51% de microglia e 15,77 ± 0,43% de astrócitos (figuras 4.1 e 4.2).

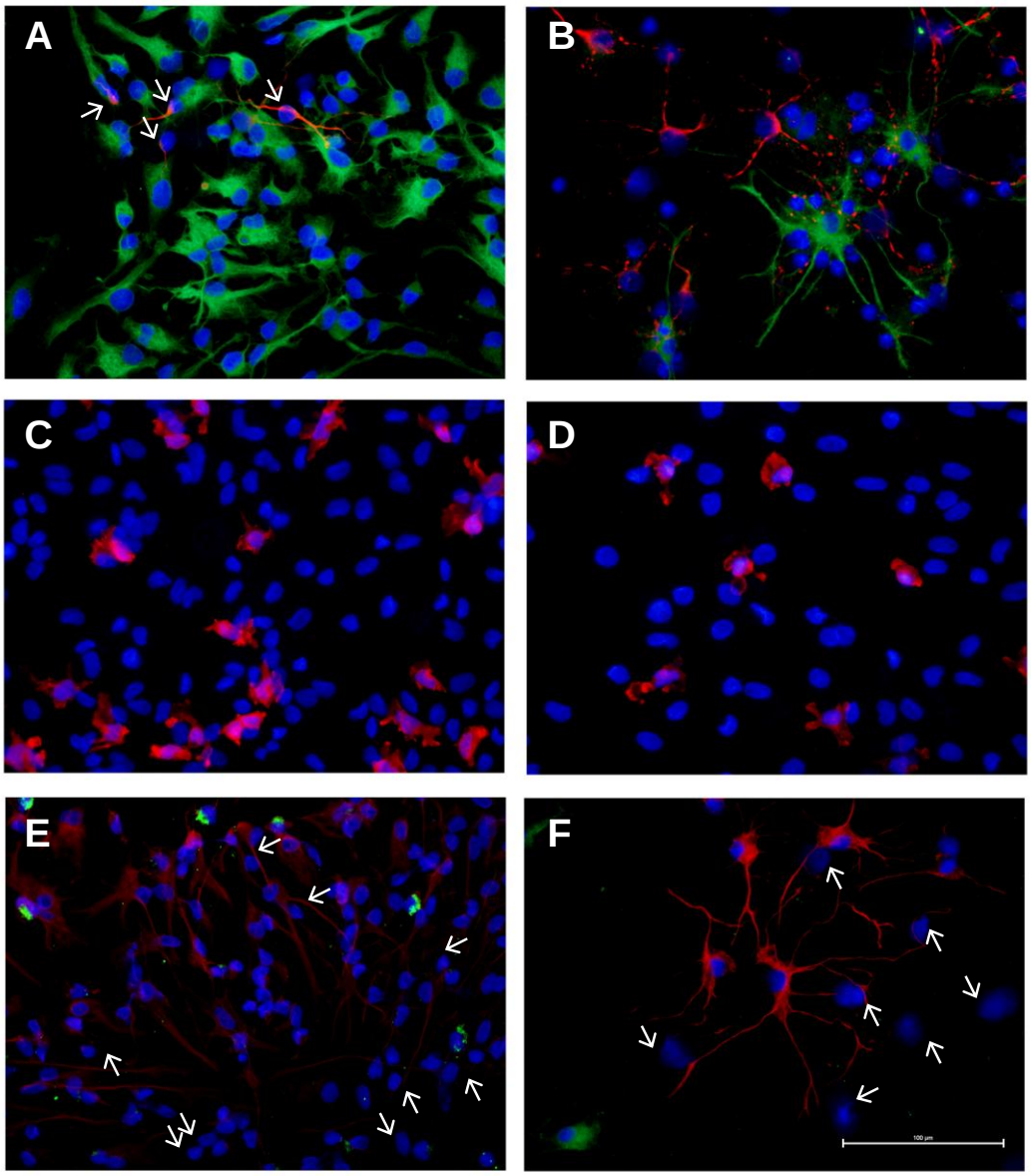
Figura 4.1 - Composição Celular das Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal.



Resultados expressos em número de células imunorreativas (% do total marcado com DAPI) ± erro padrão da média. **p < 0,01, comparação dos marcadores entre os modelos de culturas (teste t *Student*). Fonte: LOPES, D.C.F, 2010 (Comunicação Pessoal)[2]

[2] Informação fornecida por Dielly C.F.Lopes, apresentada no Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

Figura 4.2 - Caracterização Imunocitoquímica das Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal.



Fotomicrografias ilustrando o padrão fenotípico de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (A, C e E) e culturas primárias enriquecidas de neurônios (B, D e F) derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com anticorpos anti-MAP2 (A e B, vermelho), anti-GFAP (A e B, verde; E e F, vermelho), anti-IBA-1 (C e D, vermelho) e anti-lectina (E e F, verde), além da fluorescência marcada por DAPI (azul). As setas indicam neurônios (A, E e F). Escala = 100 µm. Fonte: LOPES, D.C.F, 2010 (Comunicação pessoal)[3]

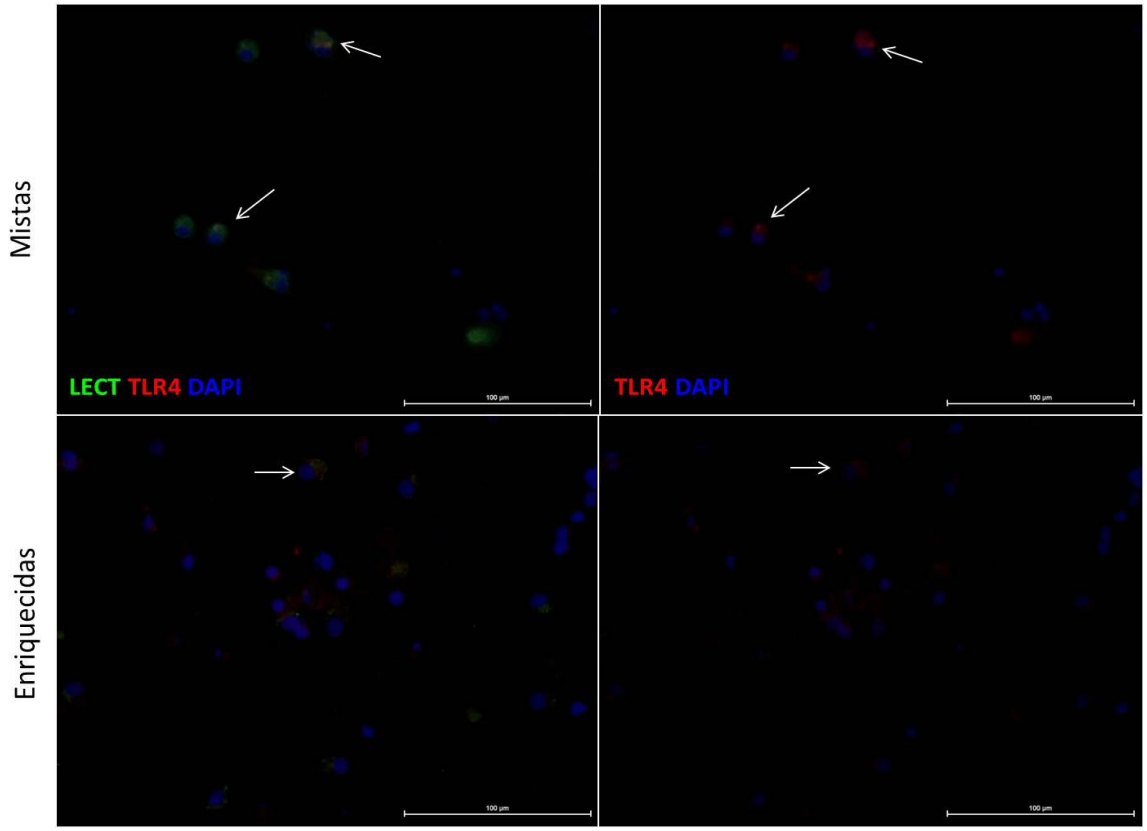
[3] Informação fornecida por Dielly C.F.Lopes, apresentada no Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

4.2 Caracterização dos Receptores TLR4 nas Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios

Após caracterizarmos a composição celular das culturas primária derivadas de ratos neonatos obtidas com o protocolo descrito no item 3.2, verificamos através do ensaio de imunofluorescência de dupla marcação, se as células corticais em cultura expressavam os receptores TLR4, o receptor para o LPS.

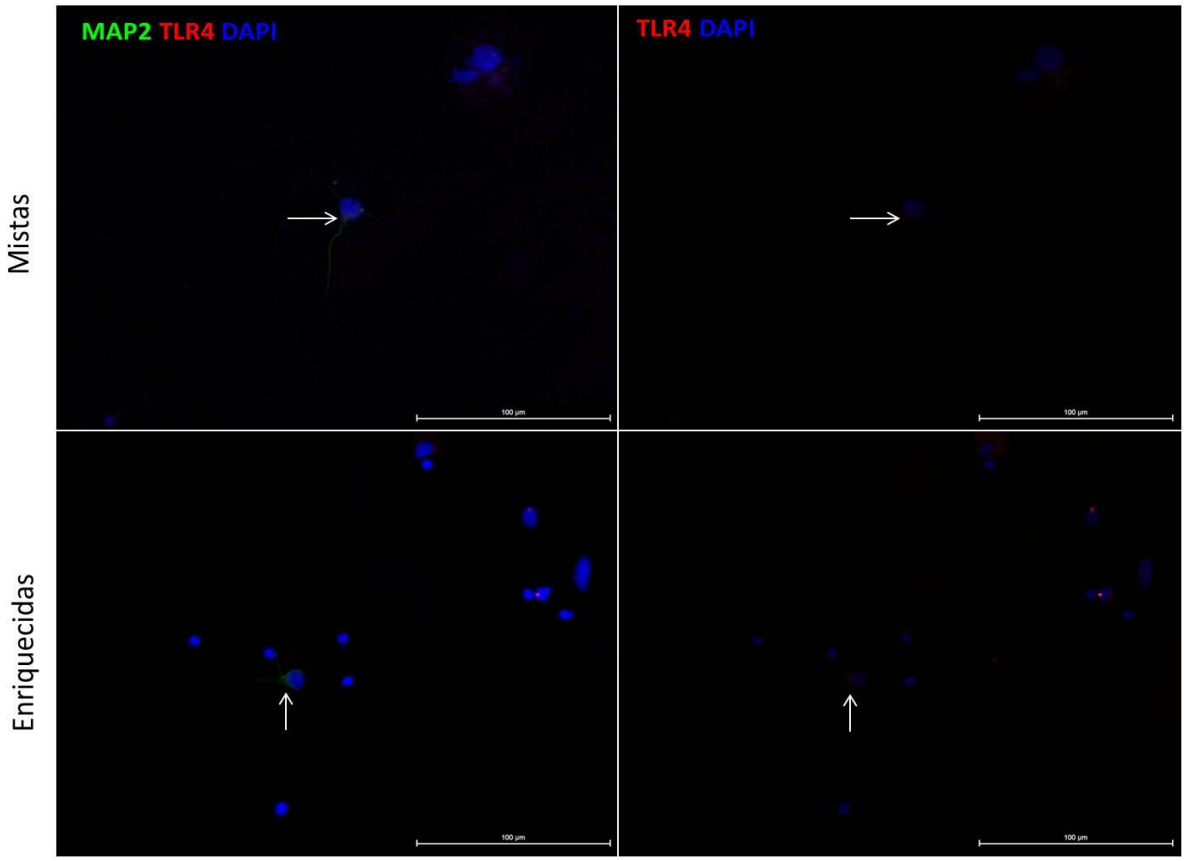
Como pode ser observado na figura 4.3, as microglias em cultura, em ambos os modelos, mas especialmente em cultura mista, expressam o receptor TLR4. Os neurônios em cultura, embora a intensidade da marcação seja um pouco menor do que aquela observada na microglia, também apresentam imunoreatividade para o receptor TLR4 em ambos modelos (figura 4.4). Em contrapartida, para os astrócitos, em nossos modelos de cultura, não observamos imunoreatividade para o receptor TLR4, independente do modelo de cultura analisado (mista e enriquecida) (figura 4.5).

Figura 4.3 – Expressão dos receptores TLR4 em Microglia de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal.



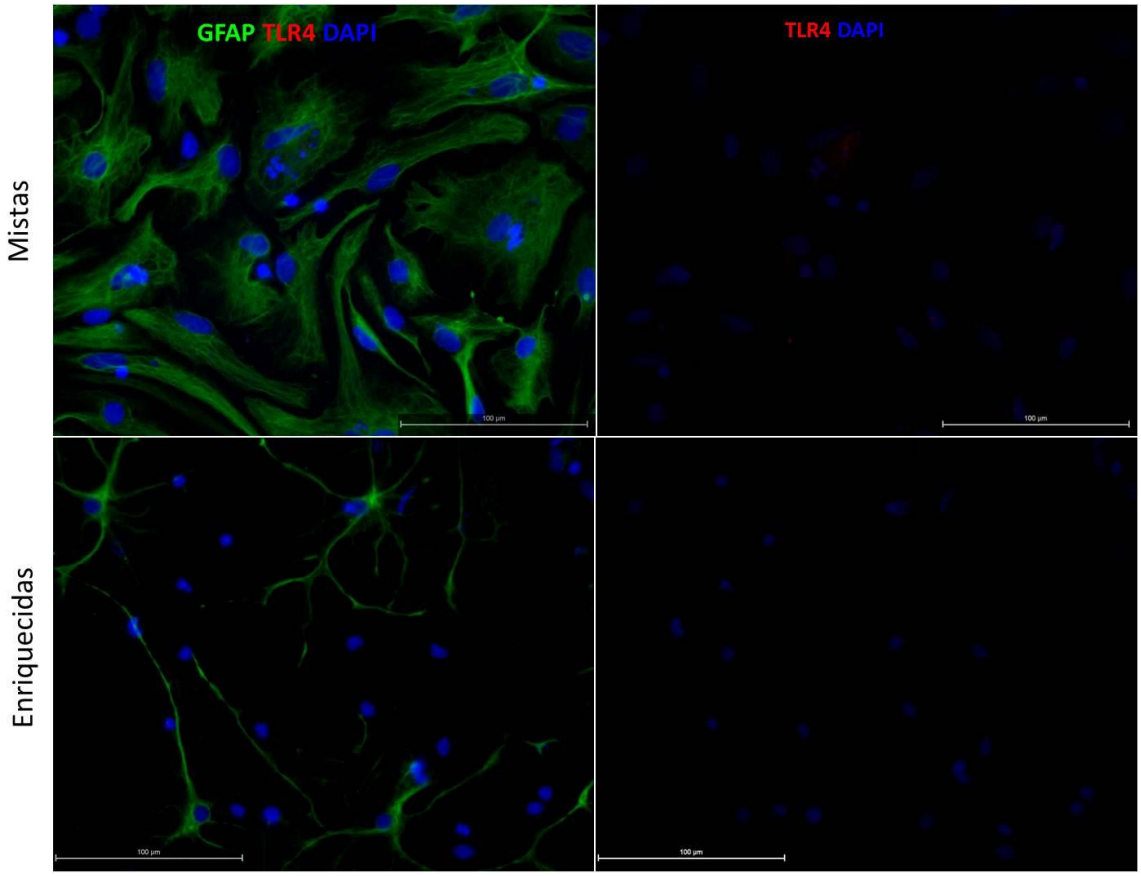
Fotomicrografias ilustrando padrão expressão dos receptores TLR4 em microglia de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (painéis superiores) e enriquecida de neurônios (painéis inferiores) derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com lectina de tomate conjugada a FitC (verde), anticorpos anti-TLR4 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). As setas exemplificam microglia com marcação positiva para TLR4. Escala = 100 µm.

Figura 4.4 – Expressão dos receptores TLR4 em Neurônios de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal.



Fotomicrografias ilustrando padrão de expressão dos receptores TLR4 em neurônios de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (painéis superiores) e enriquecida de neurônios (painéis inferiores) derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com anticorpos anti-MAP2 (verde), anti-TLR4 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). As setas exemplificam neurônios com marcação positiva ara TLR4. Escala = 100 µm.

Figura 4.5 – Expressão dos receptores TLR4 em Astrócitos de Culturas Primárias Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios Derivadas de Córtex Frontal.



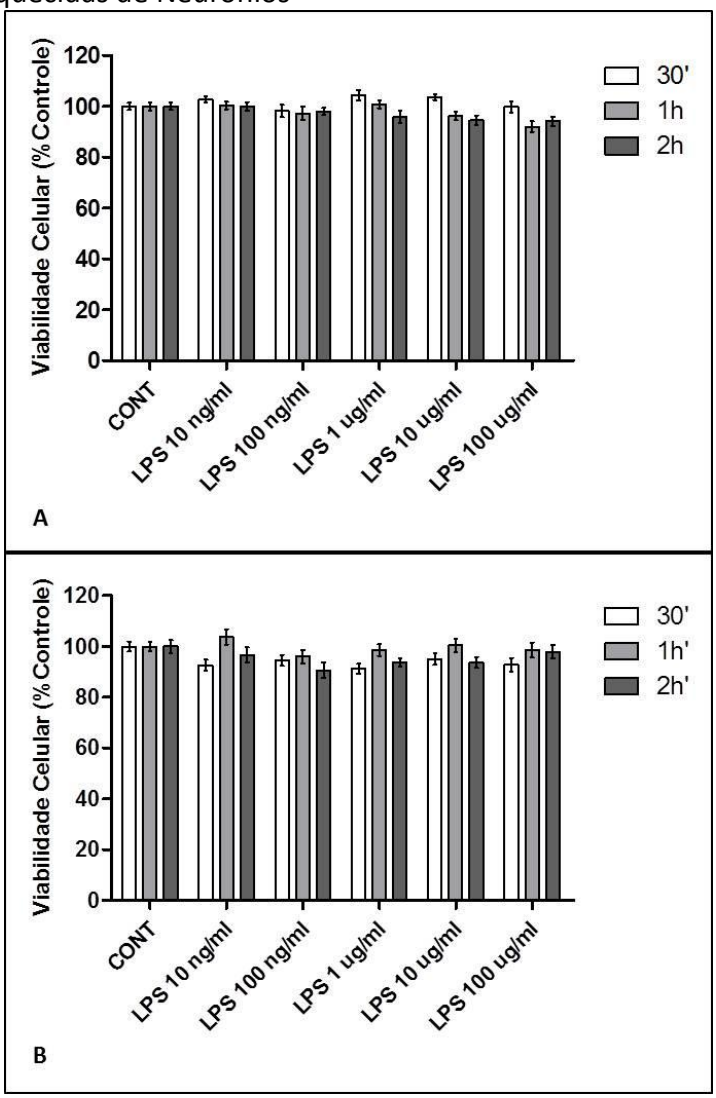
Fotomicrografias ilustrando padrão de expressão dos receptores TLR4 em astrócitos de culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (painéis superiores) e enriquecida de neurônios (painéis inferiores) derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-TLR4 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). Escala = 100 µm.

4.3 Curva de Concentração e Tempo-Resposta para o Efeito do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios

Para verificar se a exposição a concentrações e/ou tempo crescentes ao LPS, modificava a viabilidade das células em cultura, as mesmas foram tratadas no 8º DIV, como descrito no item "Materiais e Métodos".

Utilizando o método para mensurar a viabilidade celular baseado na redução de resazurina pelas células viáveis (*CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*), verificamos que a exposição ao LPS, em períodos de tempos que variaram entre 30 minutos a 2 horas, independentemente da concentração de LPS e dos modelos de culturas testados, não foi capaz de diminuir a viabilidade celular (figura 4.6A e 4.6B).

Figura 4.6 – Curva de Concentração e Tempo-Resposta para o Efeito do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios



Efeitos da administração de diferentes concentrações de LPS (10 ng/mL – 100 µg/mL) em diferentes tempos de exposição (30 min. – 2 h), sobre a viabilidade celular mensurada pela redução da resazurina de culturas mistas de neurônios/células da glia (A) e culturas enriquecidas de neurônios (B) derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle (veículo) ± erro padrão da média, de 7 experimentos independentes em quadruplicata. (ANOVA um critério, $p > 0.05$).

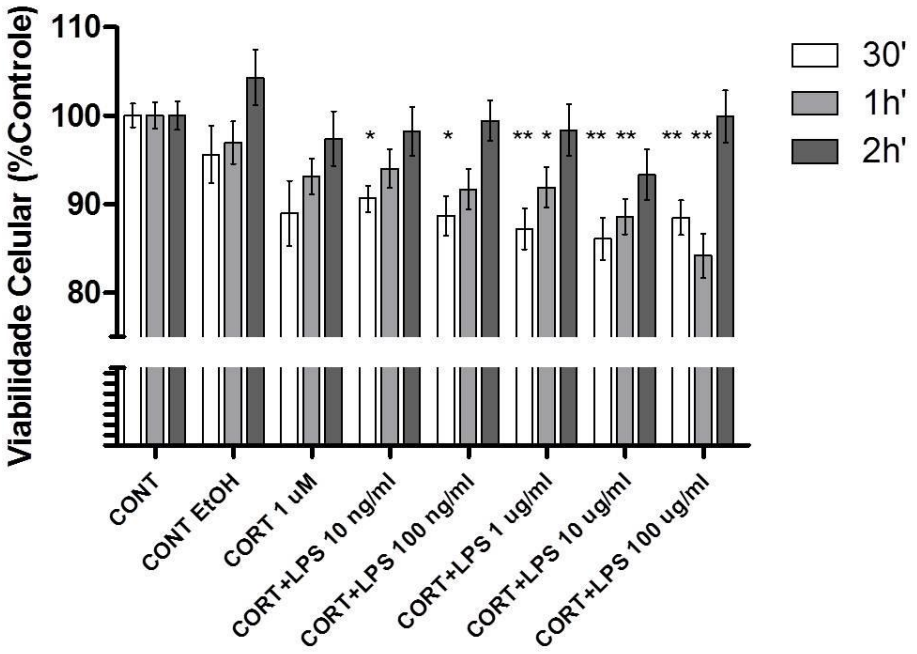
4.4 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona Seguido de LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia e Enriquecidas de Neurônios.

Para verificar se o tratamento prévio por 24 horas com o veículo (etanol a 1%) ou Corticosterona 1 µM (CORT), seguido do tratamento com concentrações e/ou tempo crescentes ao LPS modificava a viabilidade das células em cultura, as mesmas foram tratadas, no 8º DIV, como descrito no item “Materiais e Métodos”. A concentração de CORT foi escolhida baseada nos estudos realizados *in vitro* (Munhoz, 2007; Unemura *et al.*, 2012),

levando em conta a diferença de afinidade deste agonista para GR e MR. Nesta concentração, espera-se que haja saturação do GR.

Utilizando o método da rezasurina, observamos que a exposição prévia à CORT das culturas mistas de neurônios/células da glia diminuiu a viabilidade das células em cultura quando expostas a concentrações crescentes de LPS (10 ng/mL a 100 µg/mL) por 30 minutos ou quando expostas a concentrações de LPS superiores a 1 µg/mL pelo tempo de 1 hora (figura 4.7).

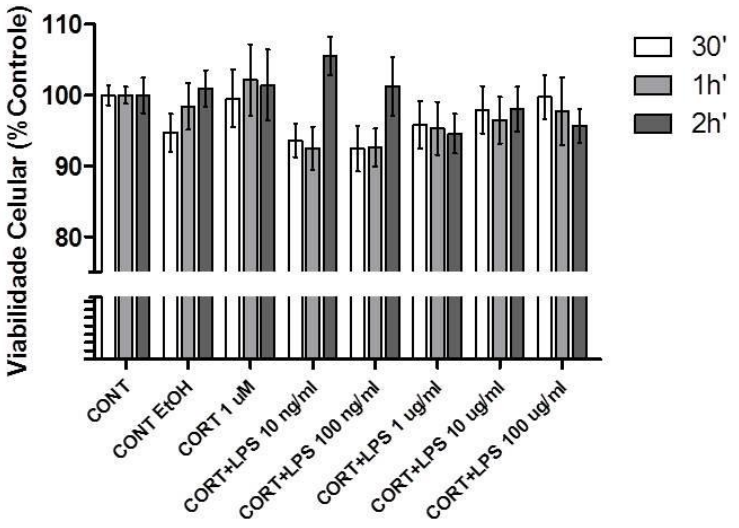
Figura 4.7 - Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona seguido do LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Mistas de Neurônios/Células da Glia



Efeitos do pré-tratamento com CORT (1 µM – 24 h) seguido do tratamento com diferentes concentrações de LPS (10 ng/mL – 100 µg/mL), em diferentes tempos de exposição (30 min. – 2 h) sobre a viabilidade celular mensurada pela redução da resazurina de culturas mistas de neurônios/células da glia derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle (veículo) ± erro padrão da média de 6 experimentos independentes em quadruplicata. *$p < 0.5$ e **$p < 0.01$ vs respectivos grupos controles (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls)

Já nas culturas enriquecidas de neurônios, a exposição prévia à CORT seguido ou não do tratamento com LPS não resultou em diminuição da viabilidade celular em nenhuma concentração de LPS e em nenhum dos tempos de exposição testados (figuras 4.8).

Figura 4.8 - Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona seguido de LPS na Viabilidade Celular de Culturas Primárias Corticais Enriquecidas de Neurônios



Efeitos do pré-tratamento com CORT (1 µM – 24 h) seguido do tratamento com diferentes concentrações de LPS (10 ng/mL – 100 µg/mL), em diferentes tempos de exposição (30 min. – 2 h), sobre a viabilidade celular mensurada pela redução da resazurina de culturas enriquecidas de neurônios derivadas de córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem do grupo controle (veículo) ± erro padrão da média de 6 experimentos independentes em quadruplicata. (ANOVA um critério, $p > 0.05$).

4.5 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

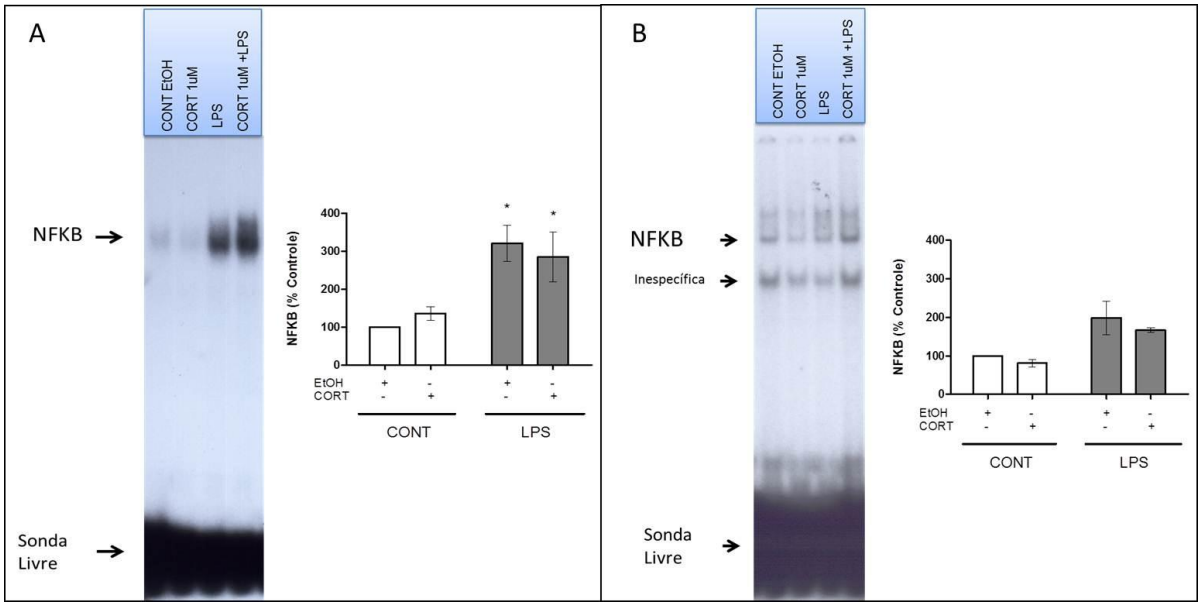
Como vimos que a CORT foi capaz de alterar a viabilidade das células em cultura somente quando expostas ao LPS, e dados de nosso laboratório mostraram que a CORT nesta concentração foi capaz de potencializar a ativação do NFKB induzida por LPS (10 µg/mL, 2 horas) em células de cultura primária mista de embriões de ratos, porém não em culturas enriquecidas de neurônios (Munhoz, 2007), decidimos avaliar se o mesmo ocorria em células em cultura provenientes de ratos neonatos após 1 hora de exposição ao LPS, tempo em que foi observado redução da viabilidade celular descrita anteriormente.

Como pode ser observado na figura 4.9, o LPS foi capaz de ativar o fator de transcrição NFKB apenas em células de culturas mistas (figura 4.9A) e a exposição prévia à CORT não foi capaz de alterar essa ativação, ou seja, embora não tenhamos observado um efeito potencializador da CORT na ativação do NFKB induzida por LPS, este hormônio também 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 não alterou a atividade do NFKB em ambos os modelos de cultura, quando comparados ao grupo controle.

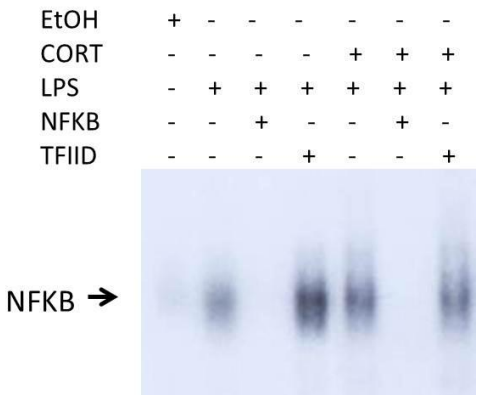
A figura 4.10 mostra a especificidade do ensaio quanto a ligação à sonda marcada para o NFKB.

Figura 4.9 - Efeitos do Tratamento Prévio com CORT seguido de LPS na Ativação do Fator de Transcrição NFKB em Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios



Efeitos do pré-tratamento com CORT 1 µM (24h) seguido pelo tratamento com LPS (10 µg/mL - 1 hora) na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (A) e enriquecidas de neurônios (B) 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 ± erro padrão da média de 8 experimentos independentes.*p <0.05 vs CONT EtOH (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.10 - Ensaio de Competição Específica e Inespecífica do Fator de Transcrição NFKB

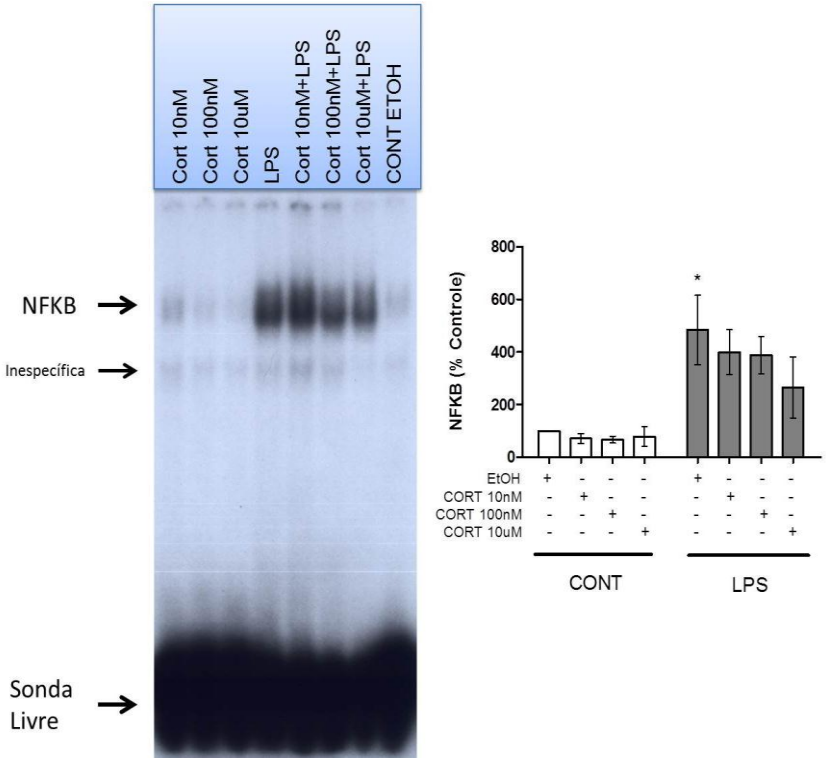


Ensaios de Competição Específica e Inespecífica do Fator de Transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Para a competição específica foi utilizado excesso de oligonucleotídeo não-marcado (NFKB) com a mesma sequência do oligonucleotídeo. Para a competição inespecífica foi utilizada excesso da sequência para o fator de transcrição TFIID. Imagem representativa de 3 experimentos independentes de EMSA.

4.6 Curva de Concentração-Resposta da Corticosterona na Ativação do Fator de Transcrição NFKB Induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais.

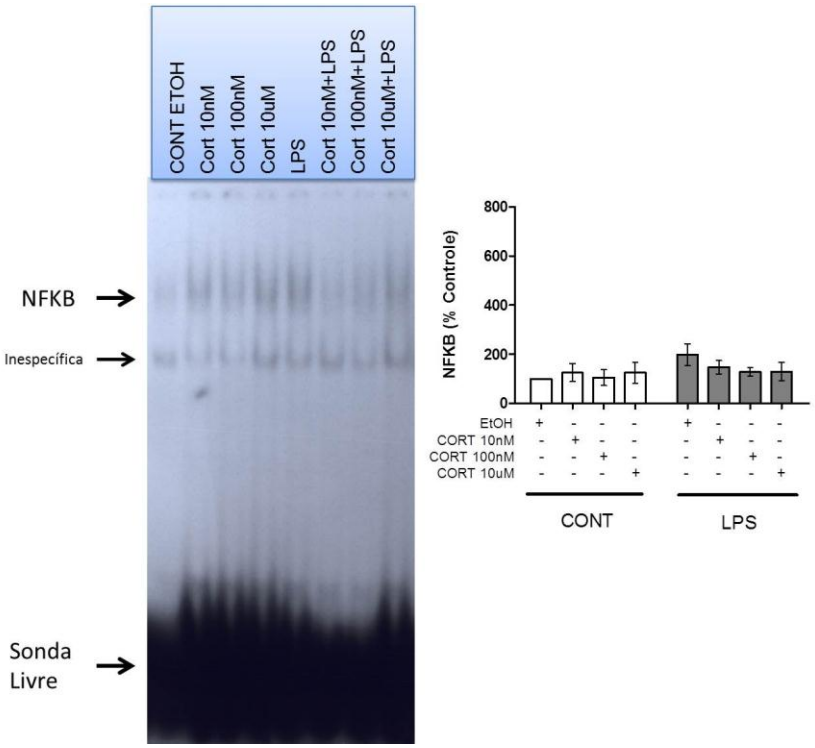
Devido à diferença das afinidades dos MR e GR à CORT, como mencionado na Introdução, decidimos avaliar se concentrações maiores (10 µM) ou menores (10 – 100 nM) deste hormônio eram capazes de modular, de maneiras distintas, a ativação do NFKB induzida por LPS. Desta maneira, culturas mistas de neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios foram pré-tratadas por 24 horas com concentrações crescentes de CORT seguidas ou não pela exposição a 10 µg/mL de LPS. Como mostram as figuras 4.11 e 4.12, o LPS foi capaz de ativar o fator de transcrição NFKB somente nas células das culturas mistas de neurônios/células da glia (figura 4.11). Nas células previamente expostas a concentrações crescentes de CORT e que foram incubadas com LPS, apesar de ser possível observar uma diminuição na intensidade da banda em filme radiográfico nos grupos CORT 100 nM + LPS e CORT 10 µM + LPS quando comparado ao grupo LPS, os valores obtidos pela análise densitométrica das bandas não mostraram-se estatisticamente diferentes. Nas células das culturas enriquecidas de neurônios, nem a exposição ao LPS ou a concentrações crescentes de CORT foram capazes de ativar o NFKB (figuras 4.11 e 4.12).

Figura 4.11 - Efeitos de Diferentes Concentrações de CORT na Ativação do NFKB Induzida por LPS em Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.



Efeitos de diferentes concentrações (curva concentração resposta) de CORT (10 nM, 100 nM e 10 µM, 24 h) seguida pelo tratamento com LPS (10 µg/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 ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes. *p <0.05 vs CONT EtOH (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.12 - Efeitos de Diferentes Concentrações de CORT na Ativação de NFKB Induzida por LPS em Culturas Enriquecidas de Neurônios.



Efeitos de diferentes concentrações (curva concentração resposta) de CORT (10 nM, 100 nM e 10 µM, 24 h) seguida pelo tratamento com LPS (10 µg/mL - 1 hora) na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias enriquecidas de neurônios 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 ± erro padrão da média de 5 experimentos independentes (ANOVA um critério).

4.7 Efeitos da adição de RU486 ao Pré-Tratamento com Corticosterona na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS em Culturas Primárias Corticais

Para verificar o envolvimento dos GR nos efeitos da CORT na ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS (item 4.5), ambos os modelos de cultura foram expostos ao antagonista deste receptor, o RU486 10 µM (Mifepristona), concomitantemente à CORT (1 µM, 24 h) seguido ou não de LPS 10 µg/mL (figura 4.13). A concentração de RU486 foi escolhida baseada nos estudos realizados por Behl et al., (Behl *et al.*, 1997).

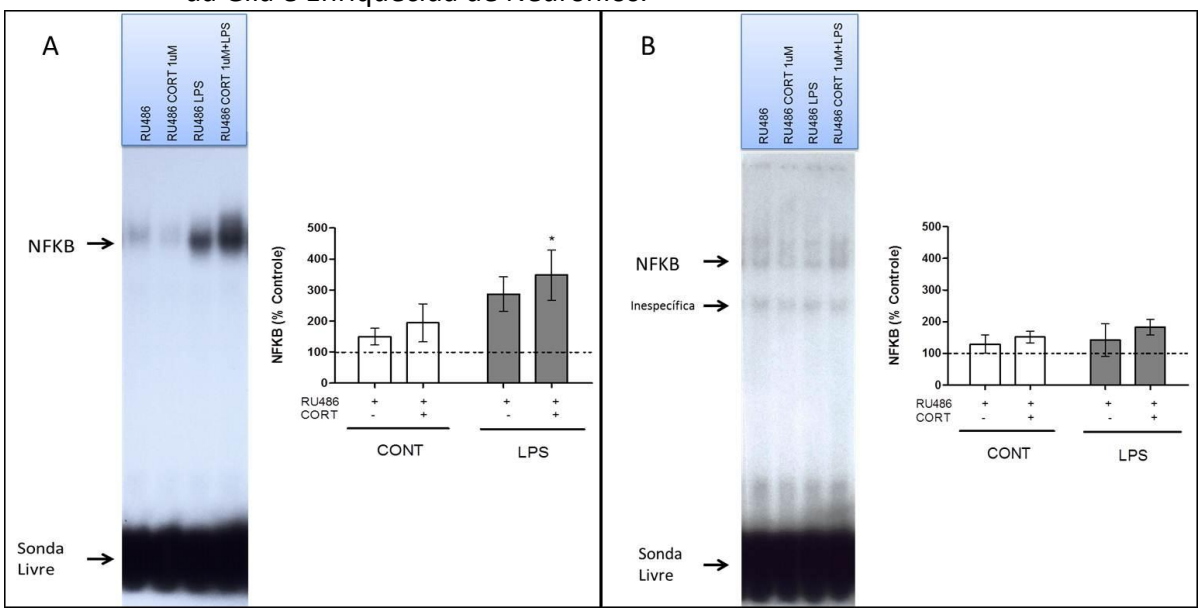
A adição do antagonista GR levou ao aumento da ativação do fator de transcrição NFKB no grupo RU486 + CORT + LPS nas culturas mistas de neurônios/células da glia (figura 4.13A). Apesar de ser possível observar um aumento na intensidade da banda no grupo RU486 LPS quando comparado ao controle em filme radiográfico, os valores obtidos pela análise densitométrica das bandas não foram estatisticamente diferentes. Ao compararmos os números absolutos de ativação/translocação dos grupos CORT+LPS (figura 4.9A) e RU486

CORT+LPS (figura 4.13A), de 305,52 ± 74,34% e 348,52 ± 81,22%, respectivamente, não observamos diferenças na ativação.

Não houve alteração na ativação (ligação ao DNA) do fator de transcrição NFKB com a adição do antagonista de GR à corticosterona seguida ou não de LPS nas culturas enriquecidas de neurônios (figura 4.13B), sugerindo que o bloqueio destes receptores não altera o padrão ativação do NFKB neste modelo de cultura e nestas condições experimentais.

Também é importante destacar que a exposição ao RU486, como também ao RU486 + CORT não foram capazes de alterar a ativação do fator de transcrição NFKB em ambos os modelos de cultura, comparados ao grupo controle (figura 4.13 A e B).

Figura 4.13 - Efeitos da adição de RU486 ao tratamento prévio com CORT seguido de LPS na Ativação do Fator de Transcrição NFKB em Cultura Mista de Neurônios/Células da Glia e Enriquecida de Neurônios.



Efeitos da adição de RU486 ao pré-tratamento com CORT 1 µM (24 h) seguido pelo tratamento com LPS (10 µg/mL - 1 hora) na ativação do fator de transcrição NFKB em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia (A) e enriquecidas de neurônios (B) 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 representado pela linha tracejada ± erro padrão da média de 3-4 experimentos independentes. (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

4.8 Efeitos do Pré-Tratamento com Corticosterona, na Presença ou Ausência de RU486, na Translocação Nuclear da Subunidade RELA do Fator de Transcrição NFKB em Culturas Primárias Corticais

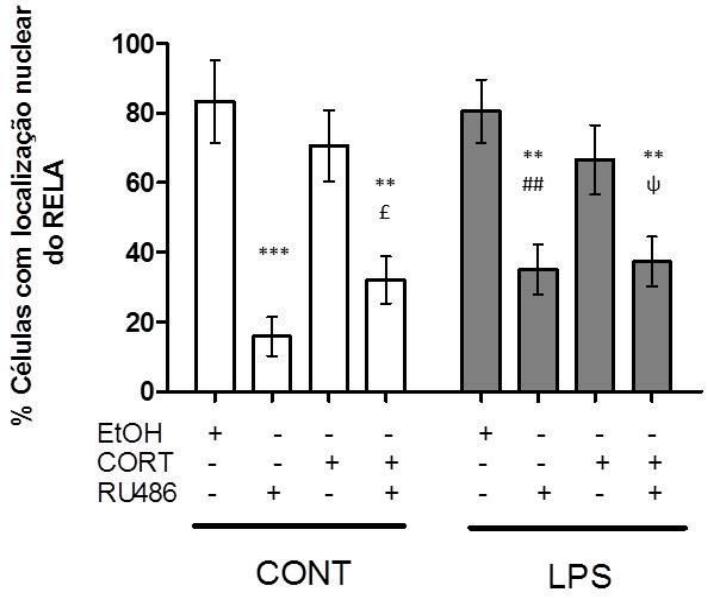
Como nossos resultados mostraram que cada modelo de cultura possui respostas diferentes frente à ativação do fator de transcrição NFKB induzida por LPS na presença ou

ausência de CORT e RU486, avaliamos, através do ensaio de imunofluorescência de dupla marcação, a contribuição de cada tipo celular para o efeito final observado na ativação do NFKB induzida por LPS na presença ou ausência do tratamento prévio com CORT e/ou RU486 em células de cultura mista e enriquecidas de neurônios, como descrito anteriormente. A translocação nuclear da subunidade RELA do fator de transcrição NFKB é considerada um indicativo de sua ativação.

4.8.1 Neurônios

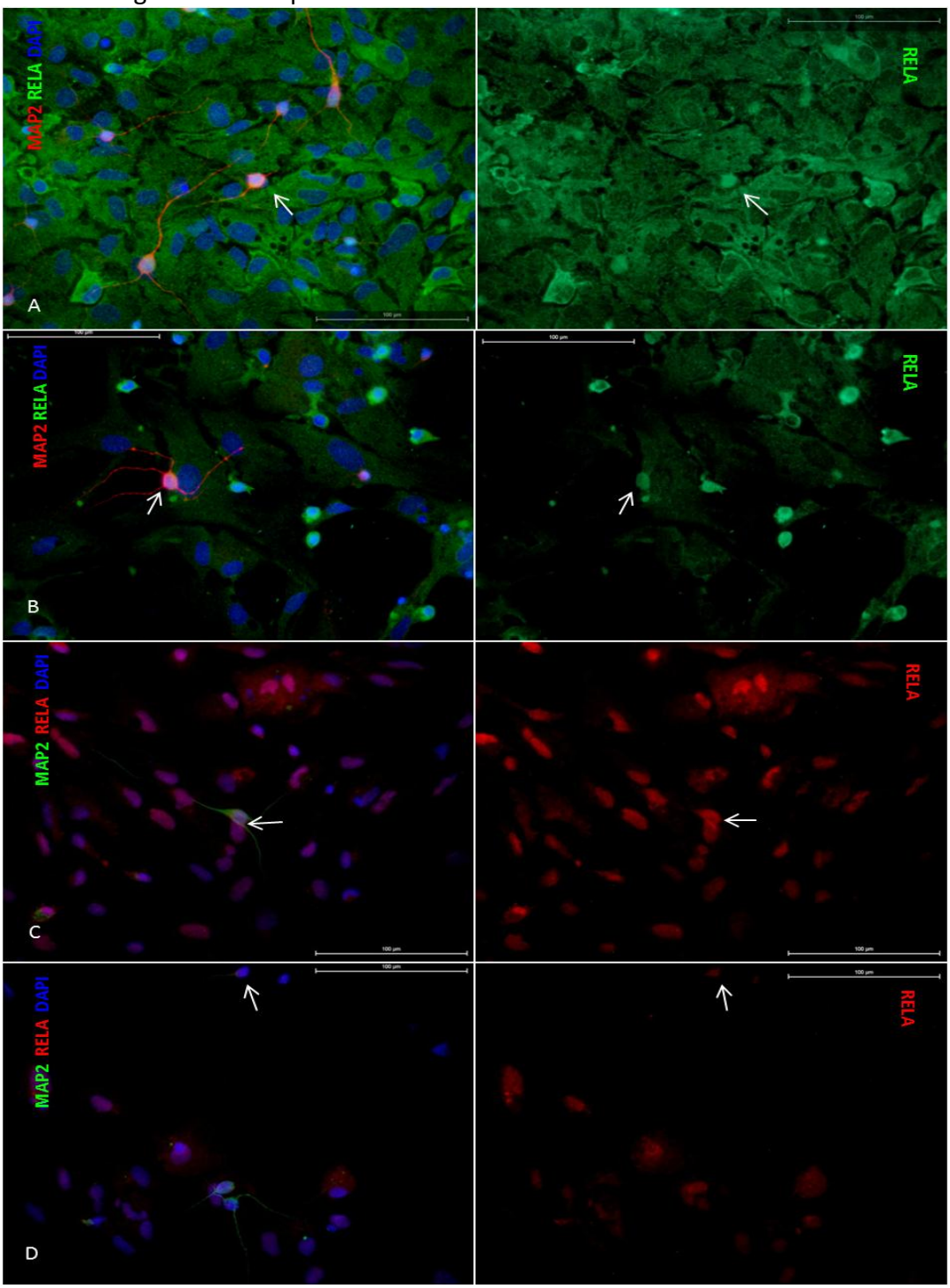
Nossos resultados mostraram que a localização nuclear basal do RELA em neurônios foi maior do que em outros tipos celulares (figuras 4.14 a 4.16), sugerindo uma ação constitutiva do NFKB nessas células. Nos neurônios em cultura mista de neurônios/células da glia, independentemente dos tratamentos realizados (CORT e/ou LPS), a localização nuclear de RELA foi em torno de 60% (figura 4.14). O bloqueio do GR pela adição de RU486 foi capaz de diminuir a localização nuclear desta subunidade inclusive nas células não estimuladas com LPS (grupo controle), quando comparado aos mesmos grupos na ausência de RU486 (figura 4.14), sugerindo que a ação constitutiva do NFKB neuronal pode ser modulada por CORT via GR.

Figura 4.14 - Localização Nuclear da Subunidade do RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.



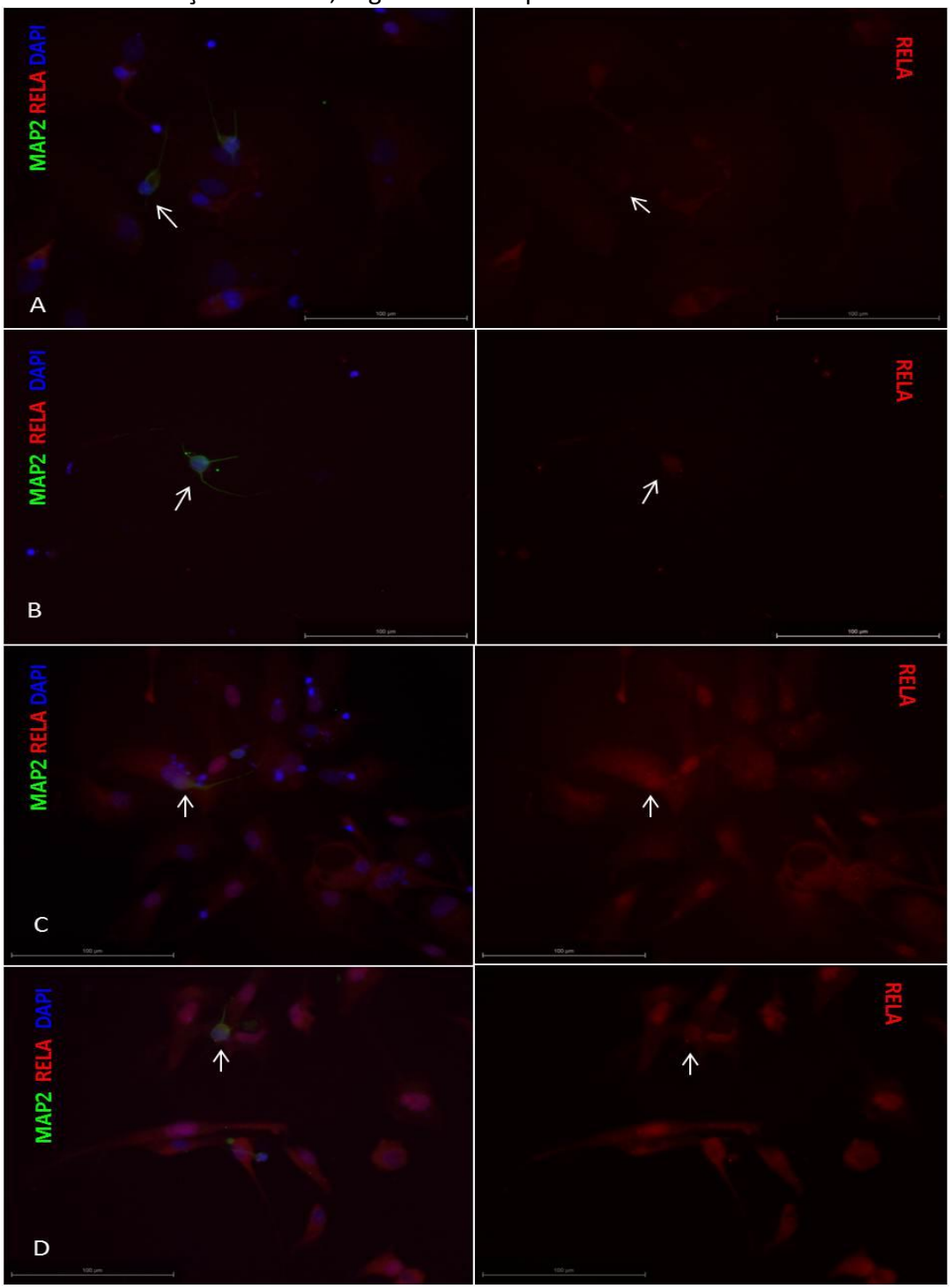
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com veículo (etanol) ou CORT 1 µM por 24 h, na ausência e presença de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, em neurônios de culturas primárias mistas de neurônio/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para MAP2 (neurônios) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. ***p<0.001 e **p<0.01 vs CONT EtOH, $^{\Psi\Psi}$p<0.01 vs CORT+LPS, $^{\#\#}$p<0.01 vs LPS, $^{£}$p <0.05 vs CORT (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.15 - Localização Nuclear da Subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mista de Neurônios /Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de neurônios expostos ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-MAP2 (A e B- vermelho, C e D - verde), anti-RELA (A e B - verde, C e D - vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam neurônios com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

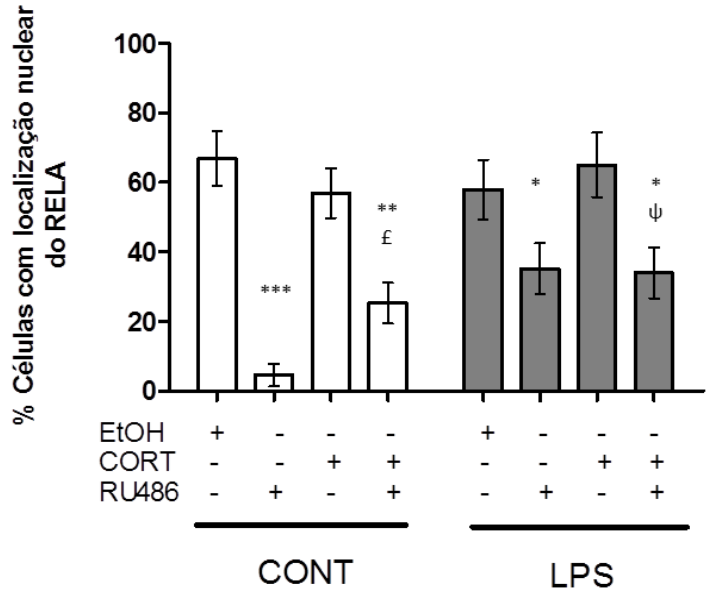
Figura 4.16 - Localização Nuclear da Subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Mistas de Neurônios/ Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de neurônios expostos ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti MAP2 (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam neurônios com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

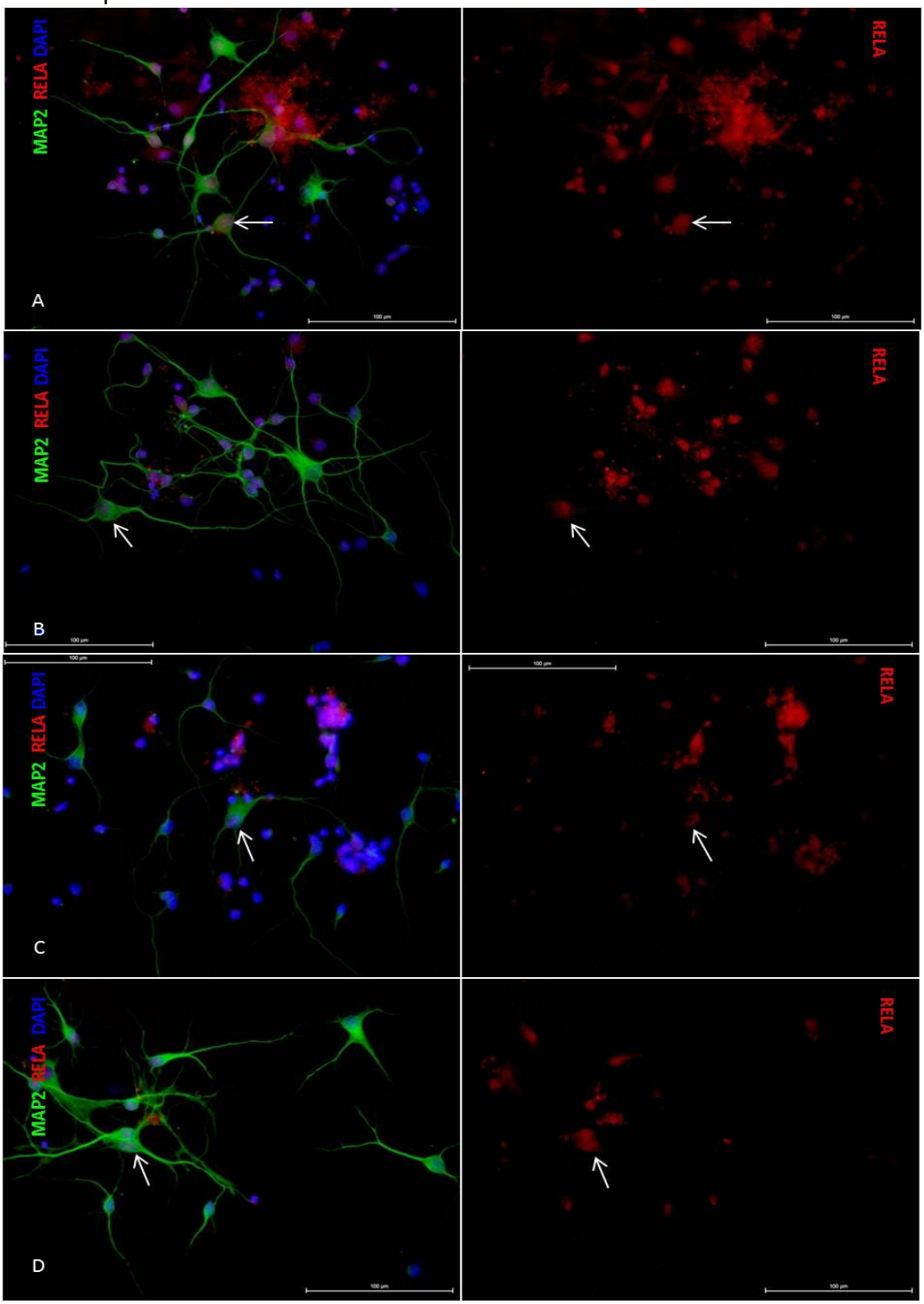
Da mesma maneira, os neurônios de culturas enriquecidas de neurônios (figuras 4.17 a 4.19) apresentaram aproximadamente 55% de localização nuclear de RELA em todos os grupos, independente se expostos ou não ao LPS e/ou CORT (figura 4.17). Novamente, o bloqueio do GR pelo RU486 foi capaz de reduzir a translocação da subunidade RELA em todos os grupos analisados, reforçando a hipótese de ativação constitutiva do NFKB neuronal e a dependência dos receptores de GR, vistas também nos neurônios de culturas mistas (figura 4.14).

Figura 4.17 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecidas de Neurônios.



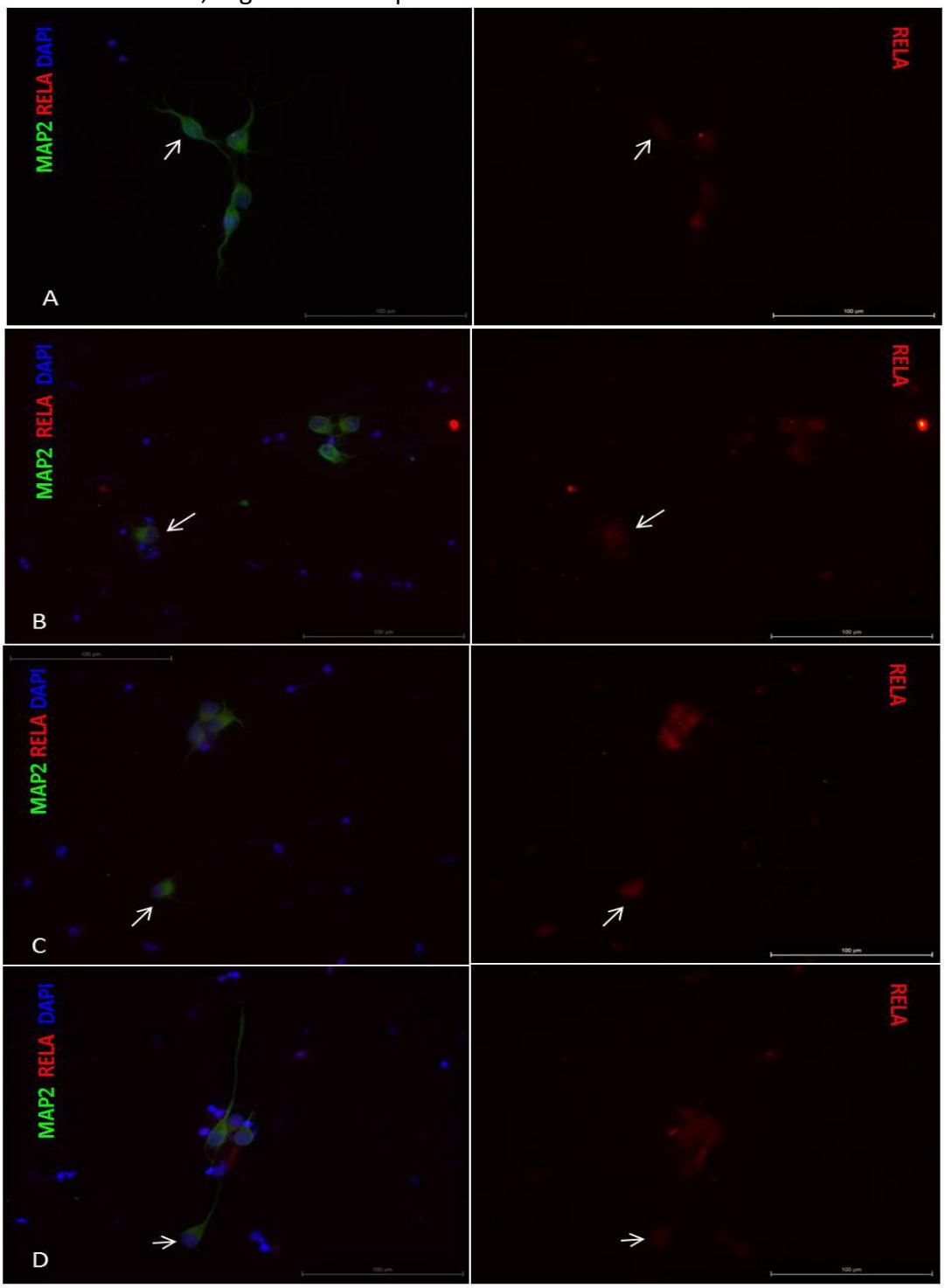
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com veículo (etanol) ou CORT 1µM por 24 h, na presença ou ausência de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, em neurônios de culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para MAP2 (neurônios) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 vs CONT EtOH, $^{\psi}$p<0.05 vs CORT+LPS, $^{£}$p <0.05 vs CORT (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.18 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de neurônios expostos ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-MAP2 (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam neurônios com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

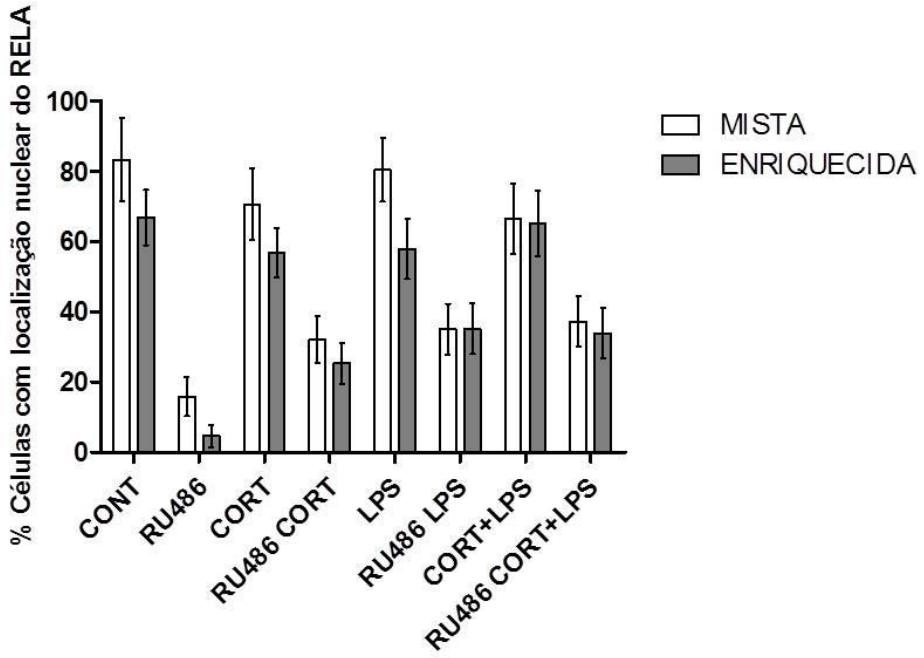
Figura 4.19 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Neurônios de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de neurônios expostos ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-MAP2 (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam neurônios com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

O gráfico de comparação da localização nuclear de RELA nos neurônios (figura 4.20) entre os modelos de cultura mista de neurônios/células da glia e enriquecida de neurônios nos mostra que não houve diferença de padrão de localização do RELA.

Figura 4.20 - Comparação da localização nuclear de RELA em neurônios entre as culturas mistas e enriquecidas de neurônios.



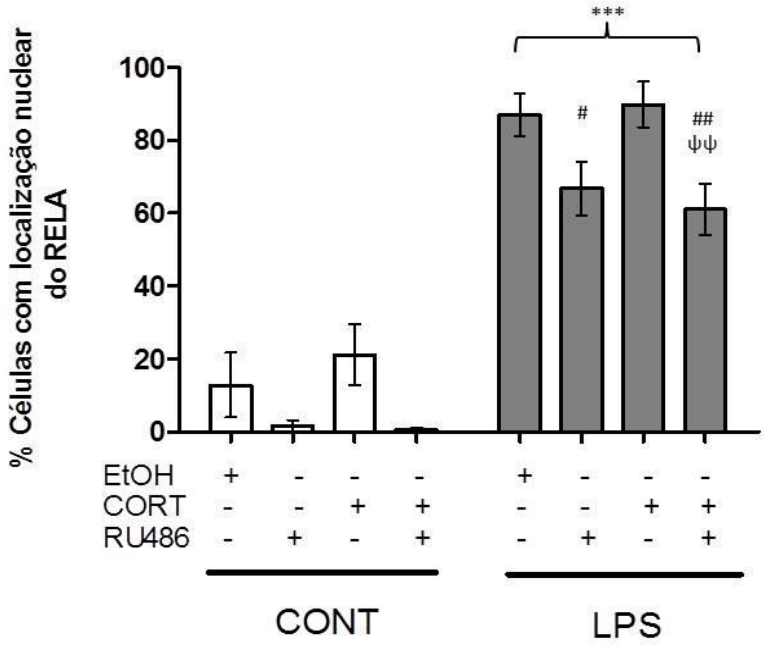
Comparação da localização nuclear da subunidade RELA após os tratamentos indicados (CONT – EtOH, CORT 1 µM, RU486 10 µM – 24 h), seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, entre as culturas primárias mista de neurônios/células da glia e enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para MAP2 (neurônios) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. (ANOVA dois critérios).

4.8.2 Microglia

Nas microglias de cultura mista de neurônios/células da glia (figuras 4.21 a 4.23), o tratamento com LPS induziu a translocação para o núcleo da subunidade RELA quando comparado ao grupo controle. O tratamento prévio com CORT não foi capaz de alterar os efeitos do LPS na translocação dessa subunidade. Porém, a inibição da sinalização via GR pela adição de RU486, foi capaz de atenuar a translocação nuclear do RELA nos grupos expostos ao LPS, na presença ou ausência de CORT, quando comparado aos mesmos grupos na ausência de RU486. Mas esta inibição não foi capaz de reverter a localização nuclear do RELA à níveis iguais aos grupos controle (figura 4.21). Podemos também observar que a

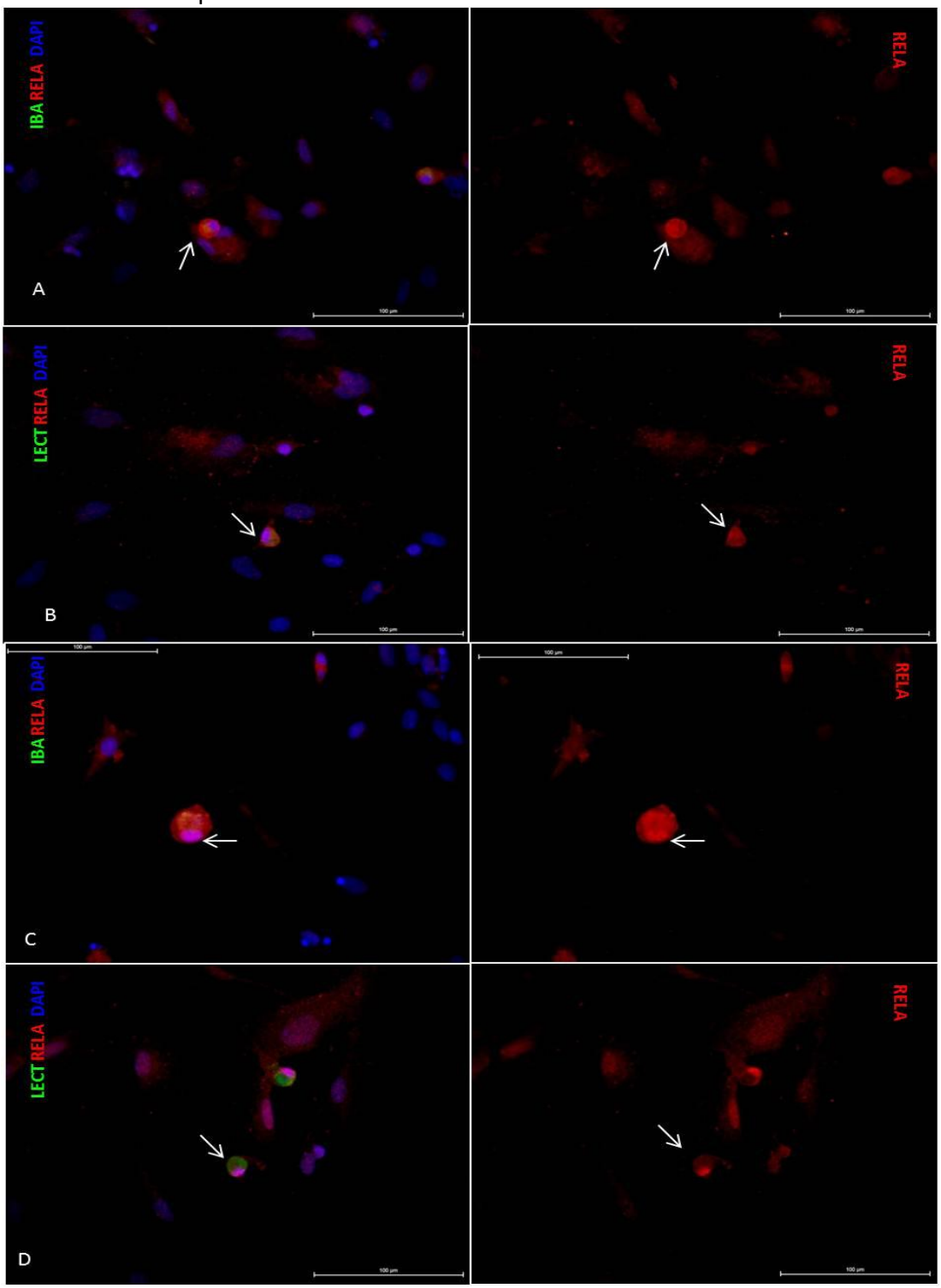
exposição à CORT, RU486 e RU486+CORT, na ausência do desafio inflamatório, não alteram a localização nuclear de RELA comparado ao grupo controle.

Figura 4.21 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.



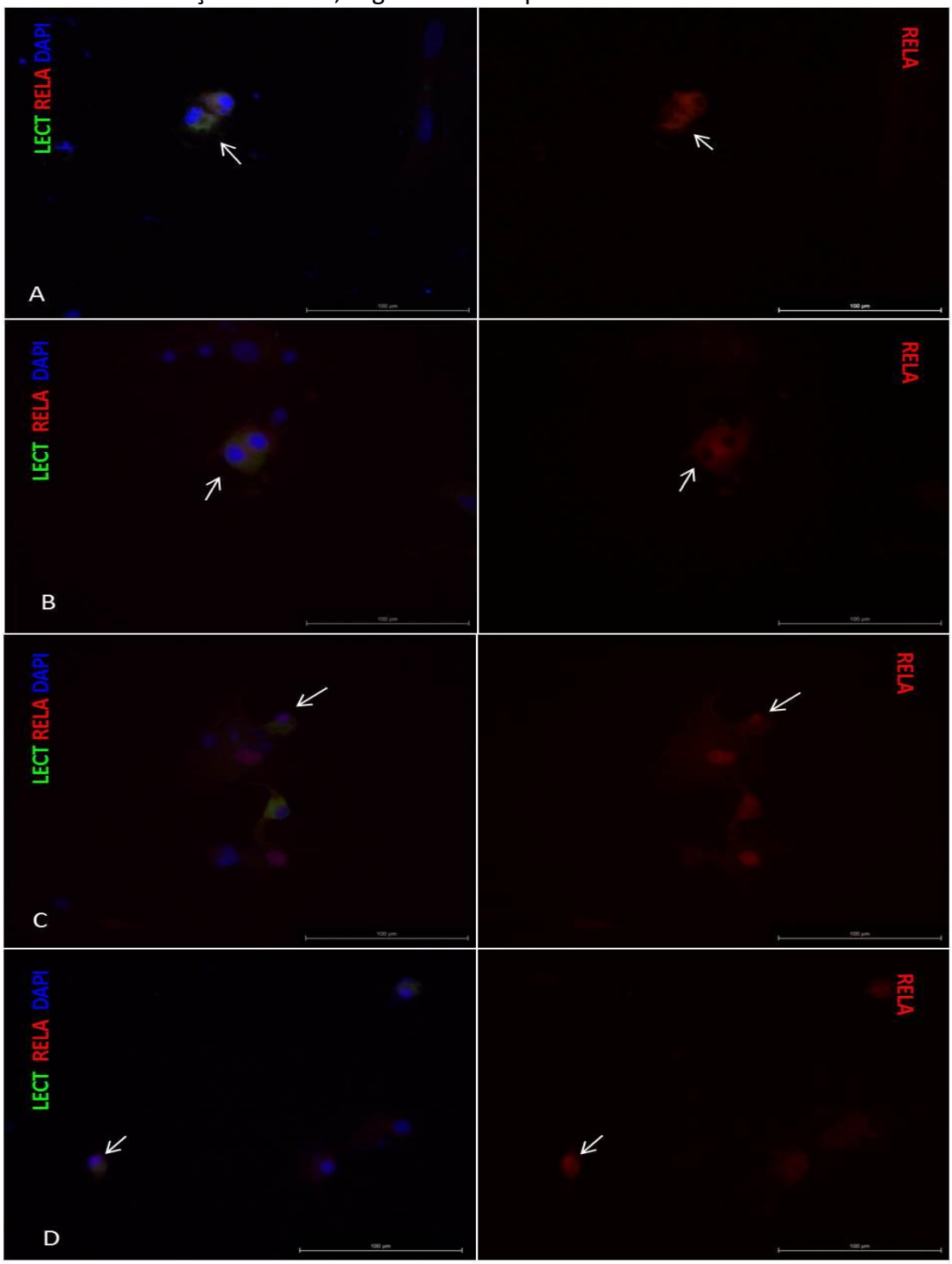
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com veículo (etanol) ou CORT 1 µM por 24 h, com ou na presença ou ausência de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, em microglia de culturas primárias mistas de neurônio/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para IBA ou lectina de tomate-FITC (microglia) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. $^{***}p < 0.001$ vs CONT EtOH, $.^{\Psi\Psi}p < 0.01$ vs CORT+LPS , $^{\#\#}p < 0.01$ e $^{\#}p < 0.05$ vs LPS, (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.22 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-IBA ou Lectina de Tomate-FITC (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam microglia com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

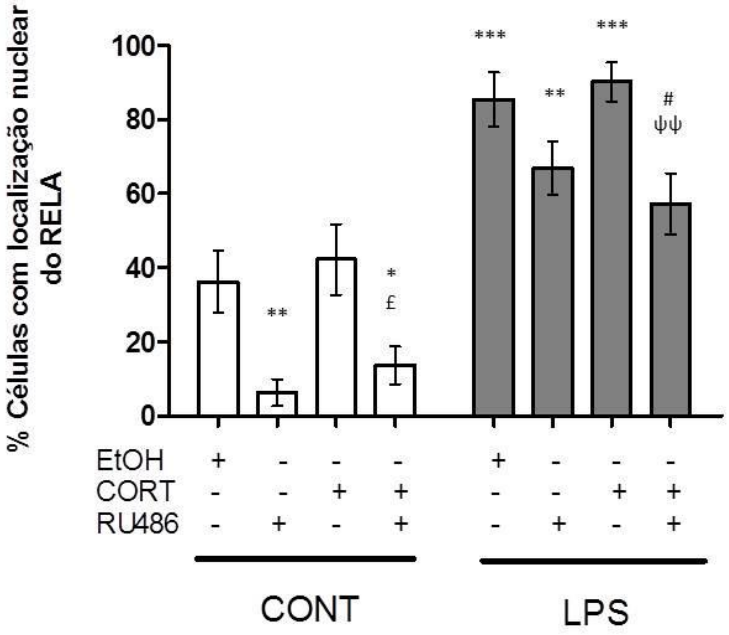
Figura 4.23 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com lectina de tomate-FITC (verde) e anticorpo anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam microglia com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

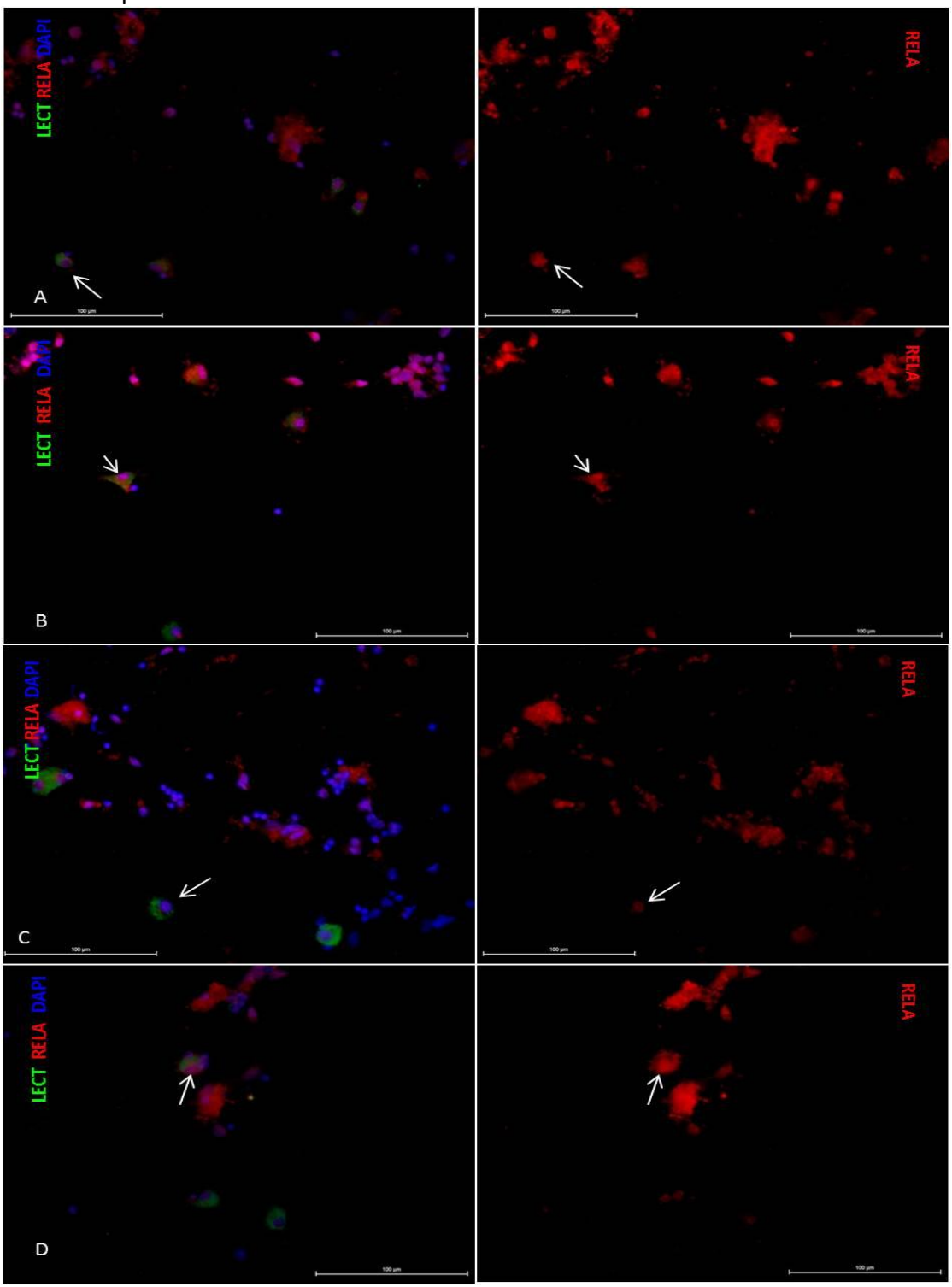
Já na microglia de culturas enriquecidas de neurônios (figuras 4.24 a 4.26), o padrão de localização nuclear do RELA nos grupos expostos ao LPS foi similar a aquele observado nas microglias de culturas mistas (figura 4.21). Ou seja, o tratamento com LPS induziu a translocação para o núcleo da subunidade RELA quando comparado ao grupo controle. O bloqueio da sinalização de GR pela adição de RU486 foi capaz de inibir, de maneira significativa, tanto a translocação basal da subunidade nas células não estimuladas, que não foram expostas ao LPS, quanto das células expostas ao LPS, independentemente do tratamento prévio ou não com CORT.

Figura 4.24 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecidas de Neurônios.



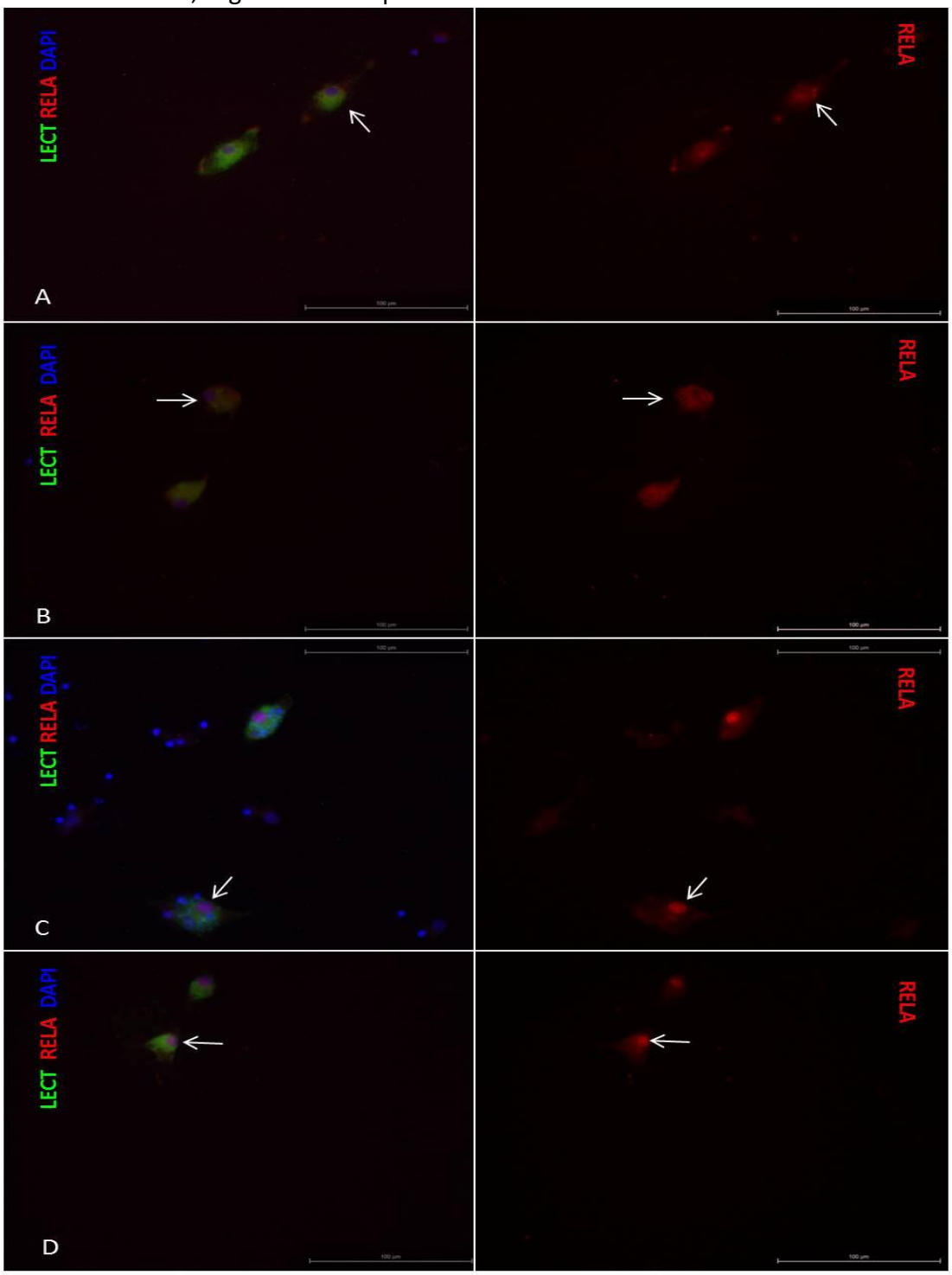
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com veículo (etanol) ou CORT 1 µM por 24 h, com ou sem adição de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, em microglia de culturas primárias enriquecidas de neurônio derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para IBA ou lectina de tomate-FITC (microglia) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ e $^{*}p < 0.05$ vs CONT EtOH, $^{\#}p < 0.05$ vs LPS, $^{\psi\psi}p < 0.01$ vs CORT+LPS, $^{£}p < 0.05$ vs CORT (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.25 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com Lectina de Tomate-FITC (verde) e anticorpos anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecidas de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam microglia com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

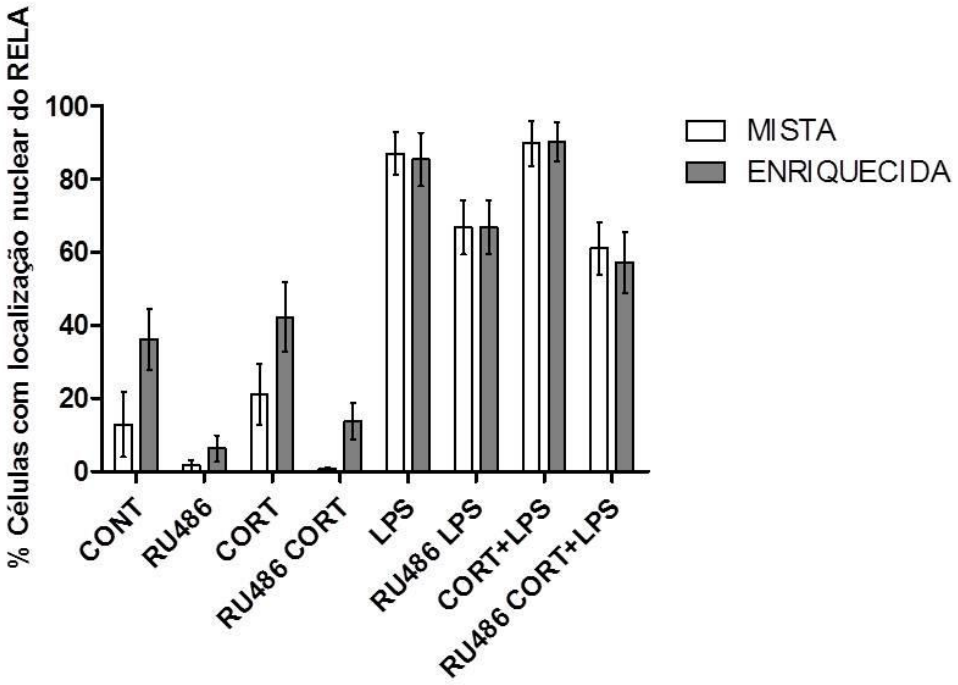
Figura 4.26 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Microglia de Culturas Enriquecida de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com Lectina de tomate-FITC (verde) e anticorpo anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecidas de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam microglia com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

O gráfico de comparação da localização nuclear de RELA na microglia (figura 4.27) entre os modelos de cultura mistas e enriquecidas de neurônios evidencia que não houve diferença de padrão de localização deste fator.

Figura 4.27 - Comparação da Localização Nuclear de RELA em Microglia entre as Culturas Mistas e Enriquecidas de Neurônios.



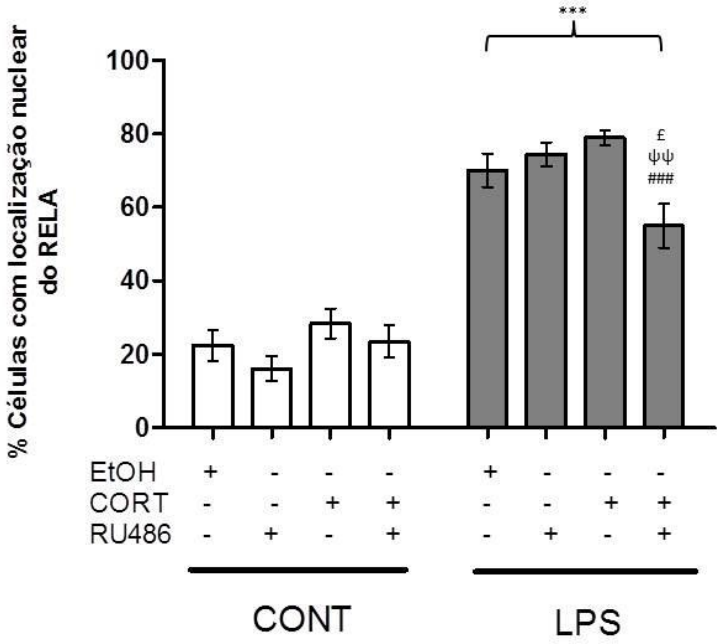
Comparação da localização nuclear da subunidade RELA em microglia após os tratamentos indicados (CONT – EtOH, CORT 1 µM, RU486 10 µM – 24 h), seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, entre as culturas primárias mistas de neurônios/células da glia e enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para IBA ou Lectina de tomate-FITC (microglia) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. (ANOVA dois critérios).

4.8.3 Astrócitos

Nossos resultados mostraram que em astrócitos de cultura mista de neurônios/células da glia (figuras 4.28 a 4.30), o LPS, aumentou a localização nuclear de RELA. Já o pré-tratamento com CORT não foi capaz de modular a translocação nuclear de RELA induzida por LPS quando comparado ao grupo exposto apenas ao LPS. Entretanto, o bloqueio de GR pela adição de RU486 foi capaz de atenuar a translocação nuclear nas células previamente expostas à CORT seguido pela estimulação com LPS, um efeito não observado nos ensaios de EMSA que avaliam a ligação do NFKB à sua sequência consenso no núcleo das células. Podemos também observar que a exposição à CORT, RU486 e RU486+CORT, na

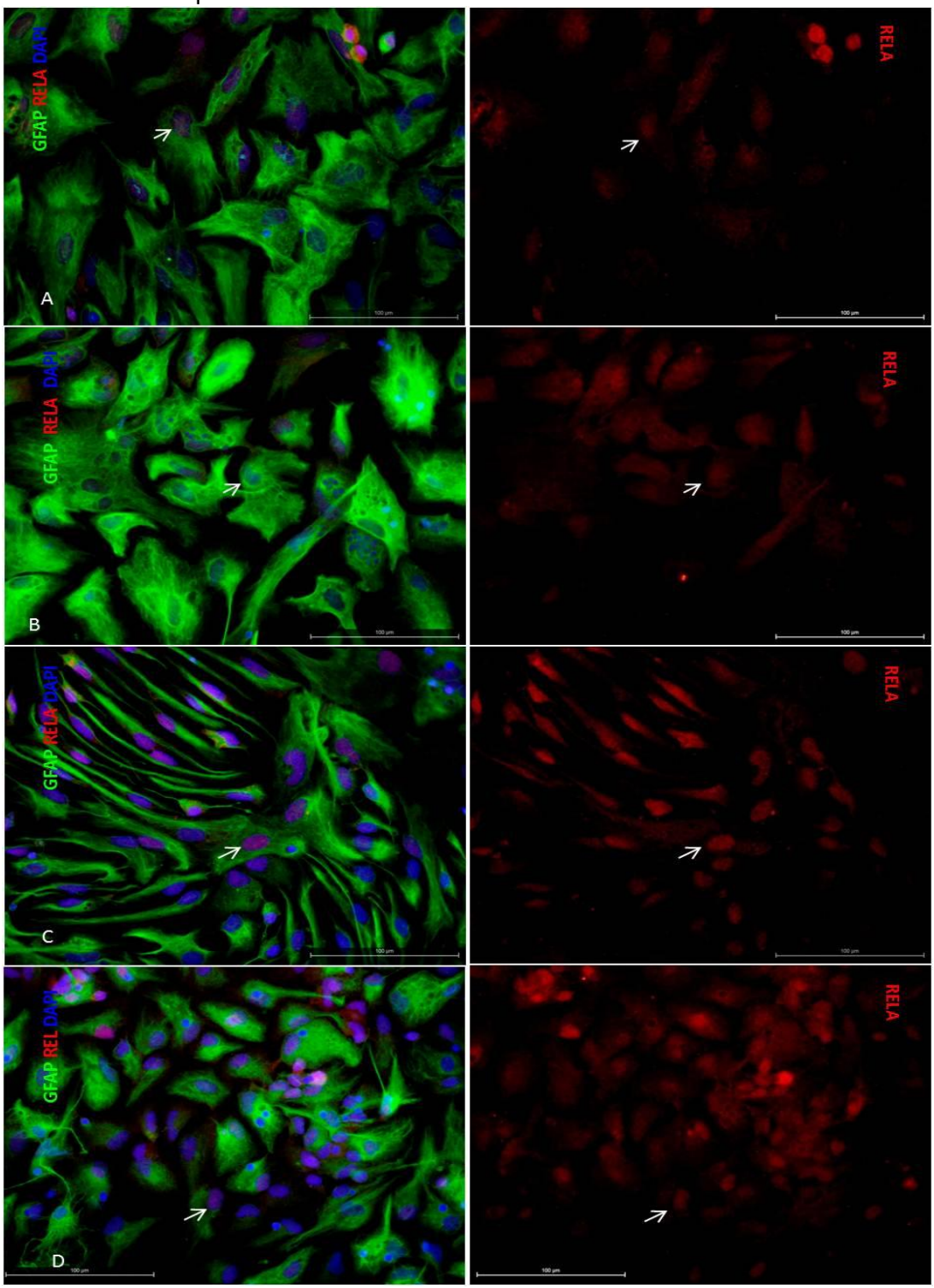
ausência do desafio inflamatório, não aumentou a localização nuclear de RELA quando comparado ao controle. Esses resultados sugerem que o GR astrocitário pode ser parcialmente responsável pela manutenção da localização nuclear do NFKB induzida pelo LPS, na presença de altas concentrações de corticosterona.

Figura 4.28 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mistas de Neurônios/Células da Glia.



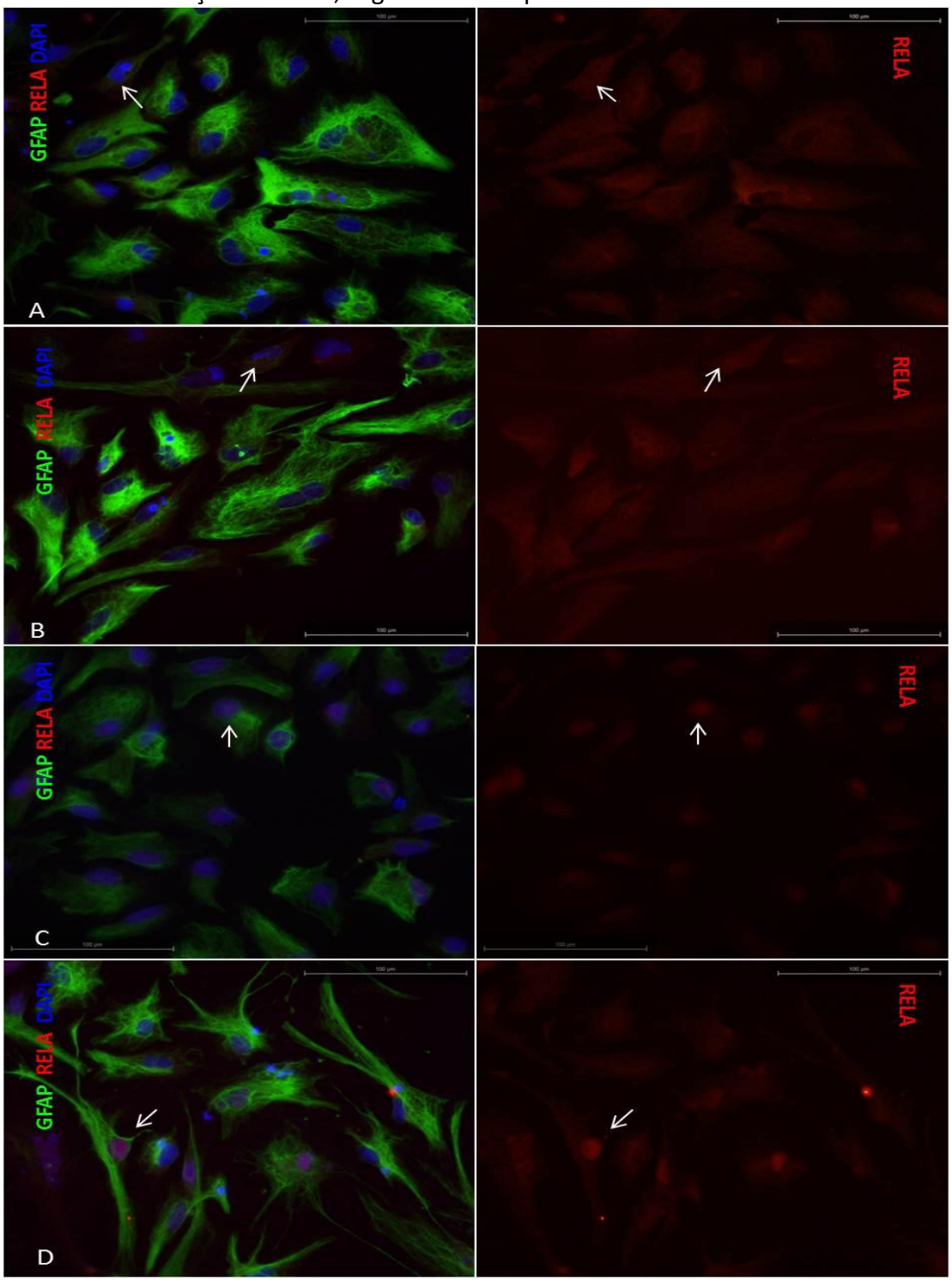
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com etanol veículo (EtOH) ou CORT 1 µM por 24 h, na presença ou ausência de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, em astrócitos de culturas primárias mistas de neurônio/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. $^{***}p < 0.001$ vs CONT EtOH, $^{###}p < 0.001$ vs CORT+LPS, $^{ψψ}p < 0.01$ vs RU486 LPS, $^{£}p < 0.05$ vs LPS (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.29 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de astrócitos expostos ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam astrócitos com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

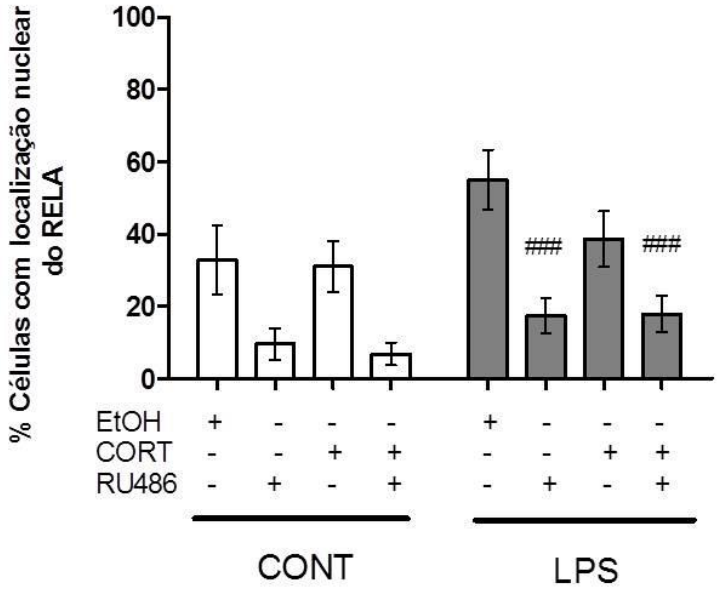
Figura 4.30 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Mista de Neurônios/Células da Glia após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486, seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias mistas de neurônios/células da glia derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam astrócitos com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

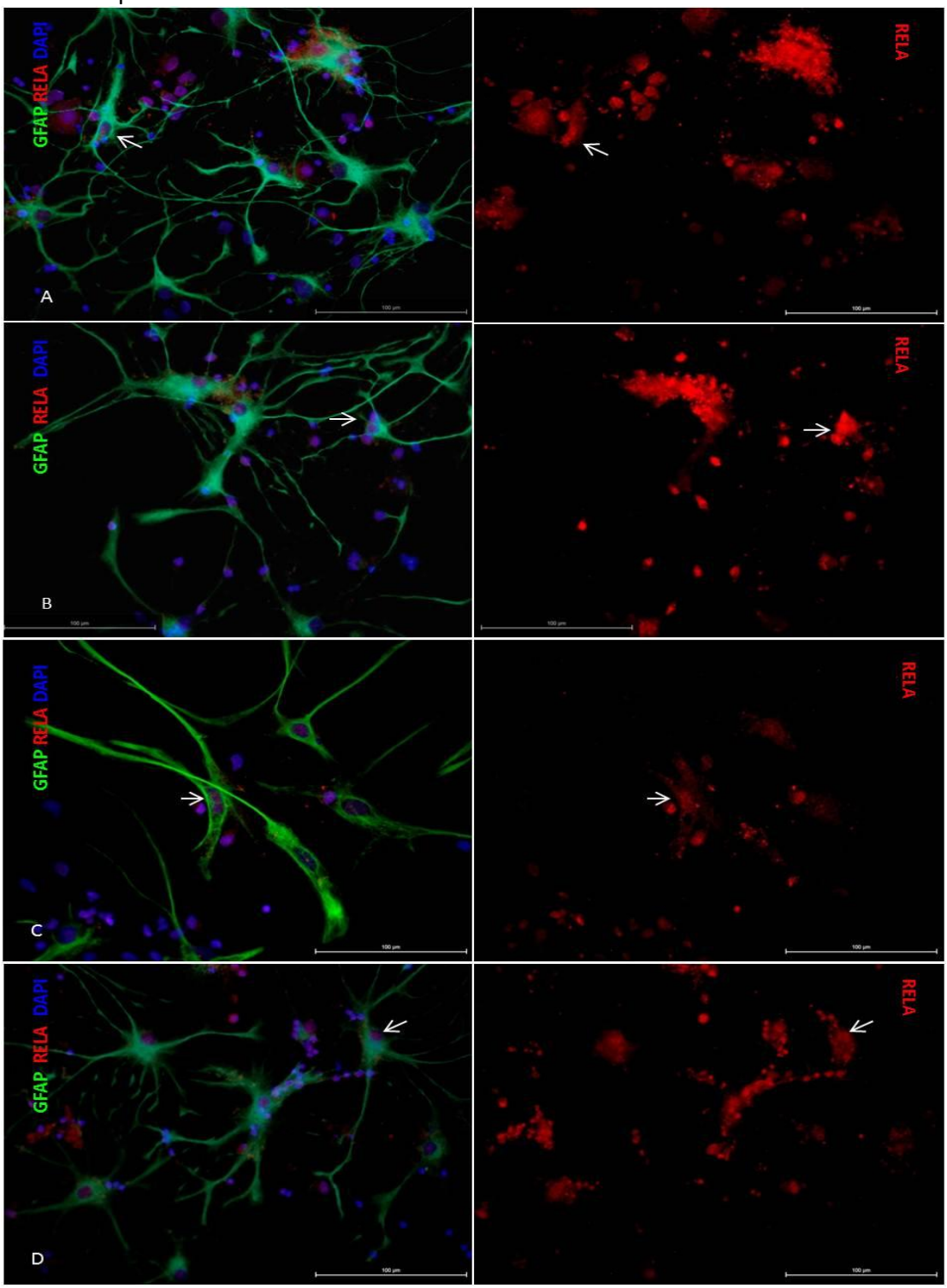
Já os astrócitos de culturas enriquecidas de neurônios não apresentaram o mesmo perfil de translocação nuclear que os astrócitos de culturas mistas (figuras 4.31 a 4.33). O LPS, diferentemente do encontrado nas culturas mistas (figura 4.28), e independente da exposição prévia à CORT e/ou RU486, não foi capaz de aumentar a localização nuclear de RELA, quando comparados ao grupo controle (figura 4.31). Esse resultado sugere que os astrócitos em cultura enriquecida não são sensíveis ao estímulo por LPS no que diz respeito à localização nuclear de RELA. Ainda, podemos também observar que a sinalização mediada por GR é importante para a translocação de RELA na presença de LPS, uma vez que a adição de RU486 levou a uma drástica diminuição da localização nuclear desta subunidade tanto no grupo RU486+LPS como também no RU486+CORT+LPS, quando comparados ao LPS sozinho (figura 4.31). Esses resultados sugerem um papel importante do receptor de GR na sinalização do fator de transcrição nuclear NFKB e sua translocação para o núcleo em astrócitos.

Figura 4.31 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios.



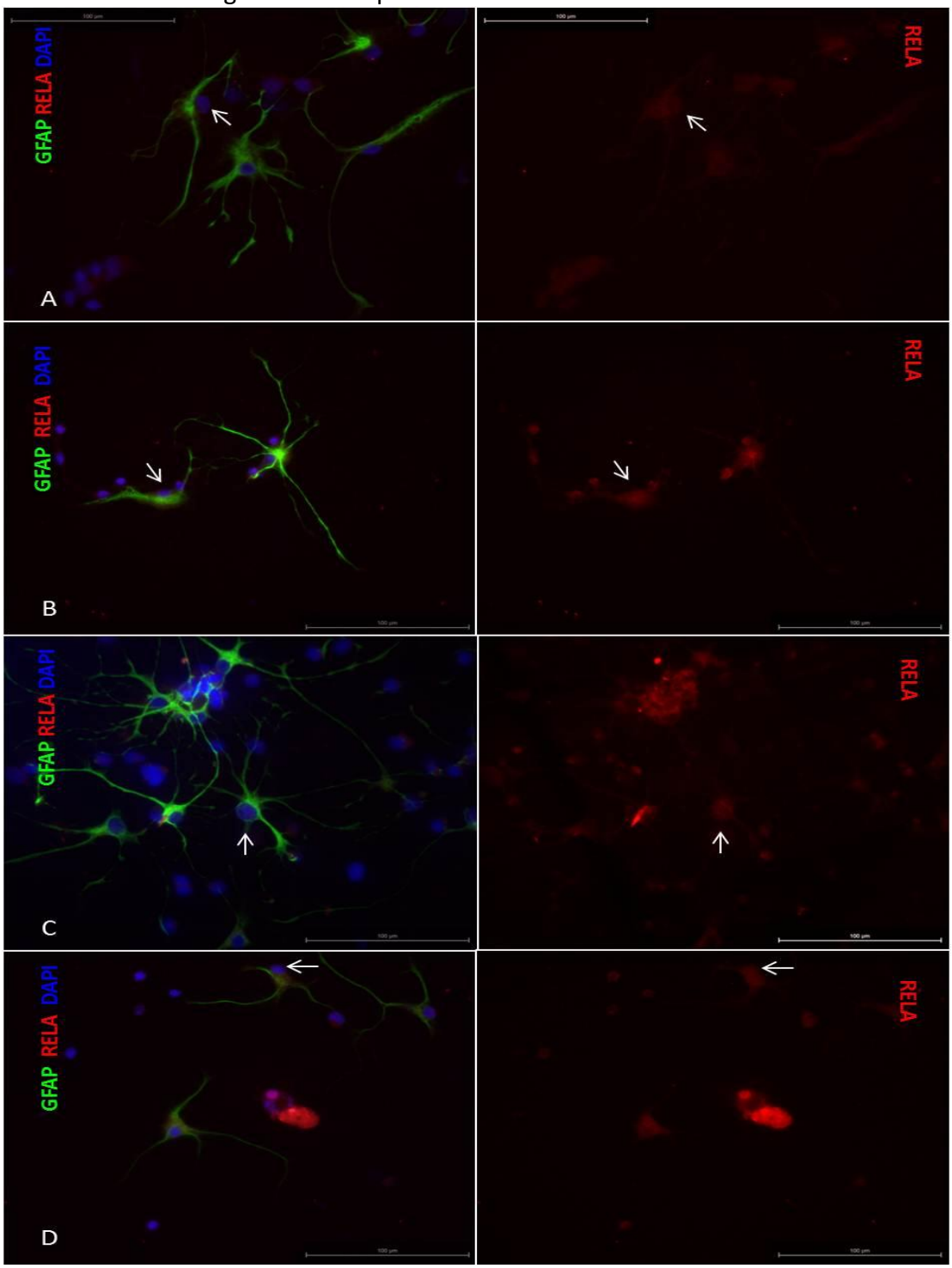
Localização nuclear da subunidade RELA após tratamento com etanol veículo (EtOH) ou CORT 1 µM por 24 h, na presença ou ausência de RU486 10 µM, seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, , em astrócitos de culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. $^{###}p < 0.001$ vs LPS (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

Figura 4.32 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de astrócitos expostos ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com etanol e PBS, (B) Culturas tratadas com CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com etanol e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam astrócitos com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm.

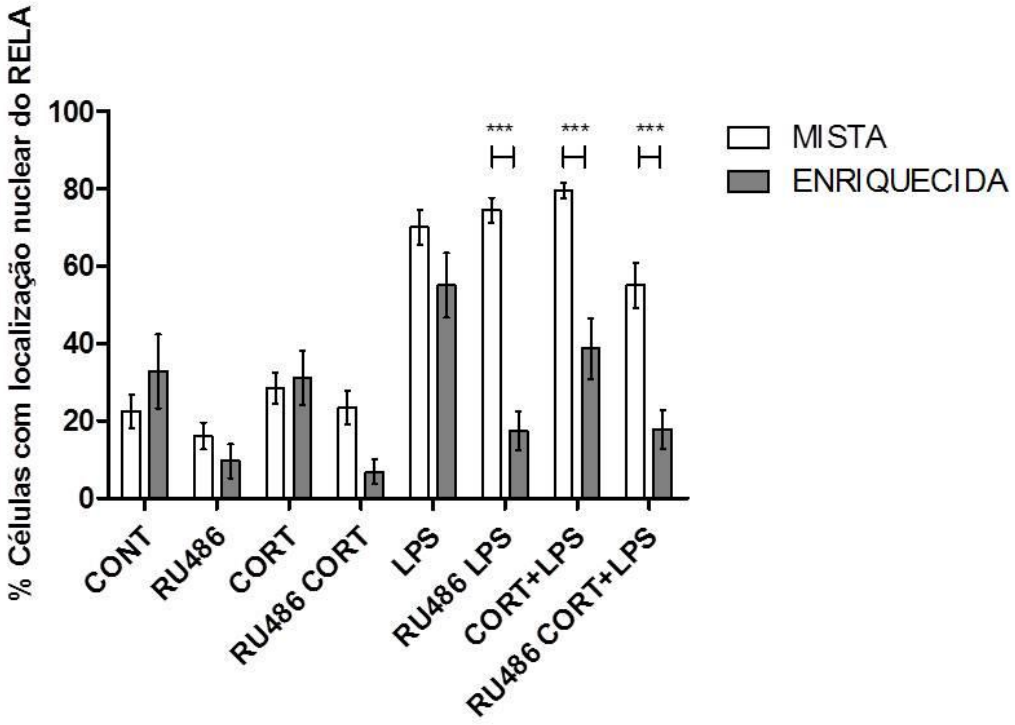
Figura 4.33 - Localização Nuclear da subunidade RELA do NFKB em Astrócitos de Culturas Enriquecidas de Neurônios após tratamento prévio com CORT na Presença de RU486 seguido ou não por LPS.



Fotomicrografias ilustrando a presença de RELA no núcleo de microglias expostas ao RU486 concomitantemente ou não a CORT (1 µM, 24 h) seguido de LPS (10 µg/mL, 1 h). Imunofluorescência realizada com anticorpos anti-GFAP (verde), anti-RELA (vermelho) e DAPI (marcador nuclear – azul) em culturas primárias enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. (A) Culturas tratadas com RU486 e PBS, (B) Culturas tratadas com RU486+CORT e PBS, (C) Culturas tratadas com RU486 e LPS 10 µg/mL e (D) Culturas tratadas com RU486+CORT e LPS 10 µg/mL. Coluna da esquerda – sobreposição das imagens; coluna da direita – RELA. As setas exemplificam astrócitos com localização nuclear do RELA. Escala = 100 µm

Ao compararmos os efeitos dos tratamentos seja CORT e/ou LPS na localização nuclear da subunidade RELA do NFKB nos astrócitos de cultura mista com aqueles das culturas enriquecidas de neurônios, (figura 4.34) observamos diferenças significantes nos seguintes grupos: RU486+LPS, CORT+LPS e RU486+CORT+LPS.

Figura 4.34 - Comparação da localização nuclear de RELA em astrócitos entre as culturas mistas e enriquecidas de neurônios.



Comparação da localização nuclear da subunidade RELA após os tratamentos indicados (CONT – EtOH, CORT 1 µM, RU486 10 µM – 24 h), seguido de PBS ou LPS 10 µg/mL por 1 hora, entre as culturas primárias mistas de neurônios/células da glia e enriquecida de neurônios derivadas do córtex frontal de ratos neonatos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de células com RELA nuclear e imunorreativas para GFAP (astrócitos) ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. $^{***}p < 0.001$ vs respectivos grupos (ANOVA dois critérios, seguido de pós-teste Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Cultura Primária

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 (Azmitia, 1990; Kivell *et al.*, 2000). Embora seja ainda bastante discutido se células, principalmente neurônios, obtidas de fetos tenham uma melhor sobrevida 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 (Brewer *et al.*, 2007; Lesuisse *et al.*, 2002a).

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, a sobrevivência das células em cultura é comparável em todas as idades testadas (Kivell *et al.*, 2000). 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 utilizadas nos nossos experimentos.

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 (Brewer, 1995; Geller *et al.*, 2001; Lesuisse *et al.*, 2002b; Velasco *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2000) e a variação de cada um desses compostos pode explicar as diferenças encontradas nos diferentes protocolos.

Por exemplo, Ahlemeyer & Baumgart-Vogt (Ahlemeyer *et al.*, 2005), 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., (Wang *et al.*, 2010) 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 citosina arabinosídeo (AraC) por 48 horas em culturas primárias derivadas de córtex frontal de ratos neonatos da linhagem Sprague-Dawley. Numakawa et al., (2007) (Numakawa *et al.*, 2007), utilizando ratos neonatais com dois dias (P2), obtiveram culturas com 80% de células positivas para MAP2 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.

Com isso, baseados na literatura e na morfologia das células obtidas em cultura, concluímos que o protocolo de cultura aqui descrito foi capaz de gerar células viáveis e pode ser considerado um bom modelo para estudos *in vitro*.

O sistema imune tem papel importante em manter a homeostase tecidual e em resposta a infecções e danos (Glass *et al.*, 2010). 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 (Hanamsagar *et al.*, 2012; O'Callaghan *et al.*, 2008).

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 a síntese e secreção de mediadores inflamatórios essenciais para a resposta imune inata e subsequente resposta adaptativa do hospedeiro (Glass *et al.*, 2010). 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 (Saijo *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). 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 (Holm *et al.*, 2012; Saijo *et al.*, 2011). Em nosso modelo, verificamos que a microglia apresentou forte marcação deste receptor em ambos os fenótipos de cultura testados, os neurônios foram fracamente marcados e os astrócitos não apresentaram marcação detectável pelo método utilizado, sugerindo a ausência de TLR4 nestas células.

A presença de TLR4 em células do SNC outras que não a microglia segue um assunto controverso (Hanamsagar *et al.*, 2012; Holm *et al.*, 2012; Lehnardt *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2007). Em estudo recente, Holm et al., (2012) demonstraram em culturas ultrapuras de astrócitos 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-1β, que contribuiriam para resposta dos astrócitos ao estímulo inflamatório (Holm *et al.*, 2012). 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 que a microglia para responder ao LPS (Saijo *et al.*, 2009).

Em relação à expressão neuronal de TLR4, a divergência na literatura é ainda maior. Enquanto Lehnardt et al., (2003) demonstraram que os neurônios não expressam TLR4 e não respondem ao LPS na ausência de microglia (Lehnardt *et al.*, 2003), Tang et al., (2007, 2008) demonstraram expressão aumentada de receptores TLR4 em neurônios após estimulação com peptídeo β-amilóide e morte neuronal dependente do receptor TLR4, já que neurônios de camundongos *knockout* para este receptor apresentaram redução na morte por apoptose induzida pelo peptídeo β-amilóide (Tang *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Esses autores discutem ainda que a expressão neuronal de TLR4 pode estar associada a estados patológicos, já que esses receptores poderiam ser induzidos em reposta a situações deletérias e de estresse (Lehnardt *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007).

5.2 LPS, Glicocorticoides e Viabilidade Celular

Como muitas doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e esclerose múltipla, estão associadas a um grande processo inflamatório [revisado em (Glass *et al.*, 2010)], decidimos avaliar se apenas a exposição ao LPS era capaz de alterar a viabilidade das células em cultura, tanto em culturas mistas como nas enriquecidas de neurônios.

Nos resultados apresentados aqui, o LPS por si só não foi capaz de diminuir a viabilidade celular em nenhuma das concentrações, tempos de exposição e modelos de cultura estudados. Esses dados vão ao encontro daqueles de Kim et al., (2000), no qual

relatam menor sensibilidade do córtex aos danos induzidos por LPS (72 h) entre as culturas primárias mistas de várias regiões derivadas do cérebro de embriões de ratos expostas a concentrações crescentes de LPS (1 ng/ml a 1 µg/ml) (Kim *et al.*, 2000) .

Os trabalhos que mostram que o LPS poderia ser neurodegenerativo relatam que esse efeito ocorre apenas após exposição prolongada ao PAMP, por alguns dias ou meses, após uma única injeção de LPS perifericamente (Ling *et al.*, 2006). Ainda, a ausência de diminuição da viabilidade celular por LPS aqui relatada foi observada mesmo na vigência da exposição à alta concentração de K^+ extracelular, que segundo alguns trabalhos, potencializa os efeitos inflamatórios induzidos por LPS (Chang *et al.*, 2000; Lehnardt *et al.*, 2003).

No SNC, flutuações de K^+ extracelular ocorrem tanto em condições fisiológicas quanto em situações patológicas. As variações locais e fisiológicas na concentração de K^+ ocorrem após atividade neuronal, podendo alterar os níveis basais (3 mM) para níveis tão elevados quanto 10-12 mM, este último considerado nível "teto" dependendo da região do cérebro (Somjen, 2002). Essa concentração "teto" é excedida somente em condições patológicas. Níveis patológicos de K^+ extracelular são atribuídos a hiperexcitabilidade e morte celular, como as que ocorrem em uma atividade epiléptica, quando a concentração de K^+ chega a 15 mM, ou durante estados de anóxia, hipoglicemia e depressão "alastrante" (*spreading depression* - SD) quando a concentração de K^+ pode aumentar a níveis de 30-80 mM. Segundo Chang et al., (2000), a adição de 20 mM de KCl mimetizaria uma SD, levando ao aumento da neurotoxicidade ao LPS de culturas primárias corticais mistas de neurônios/células da glia de embriões de camundongos (Chang *et al.*, 2000). O mesmo foi verificado em culturas primárias corticais mistas de astrócitos/microglia e em culturas primárias corticais enriquecidas de microglia derivadas de camundongos neonatos. Neste estudo, o LPS (10 µg/mL por 5 dias) induziu neurotoxicidade apenas quando foi utilizando a mesma concentração aqui utilizada de 20 mM de K^+ extracelular (Lehnardt *et al.*, 2003). Esses autores observaram que este tratamento induziu perda axonal, de oligodendrócitos e de microglia em culturas primárias mista de neurônios/ células da glia de embriões de ratos. A perda axonal e de dentritos também foi observada em cultura primária da espinha dorsal de embriões de camundongos e embriões de galinha, como também em co-cultura primária de células de gânglios da raiz dorsal de embriões de galinha e células primárias mista de glia. E que ainda, estes efeitos decorrentes do LPS nestas culturas foram dependentes da presença da microglia (Lehnardt *et al.*, 2003). Um dos mecanismos sugeridos por Chang et

al., (2000) foi que a elevada concentração de K^+ extracelular pode levar ao aumento da produção de mediadores inflamatórios como NO e TNF-α pelas células da glia (Chang *et al.*, 2000).

Por esse racional e devido ao fato dos astrócitos serem responsáveis pela manutenção da concentração de K^+ extracelular via captura por canais compostos pelas proteínas chamadas panexinas, por transportadores, como a Na^+/K^+ ATPase, e por dissipação, processo chamado de tamponamento espacial, parcialmente dependente das junções do tipo GAP [revisado em (Scemes *et al.*, 2012a)], esperávamos que as células em culturas enriquecidas, com uma população reduzida de astrócitos, fossem particularmente sensíveis à neurotoxicidade induzida por LPS, o que não ocorreu.

Como controle de nosso modelo, os mesmos ensaios de viabilidade celular foram realizados em células expostas ou não ao KCl (dados não mostrados). Nossos resultados mostraram que a presença de concentrações elevadas de KCl não altera a viabilidade das células controles, não expostas ao LPS, em cultura.

Os GCs são os principais hormônios sinalizadores de estresse e os fármacos anti-inflamatórios mais prescritos para o tratamento de inflamação crônica (Schweingruber *et al.*, 2012) e na redução de edema cerebral (Kaal *et al.*, 2004). Entretanto, é bem estabelecido que concentrações elevadas de GCs podem aumentar o dano cerebral induzido por trauma, isquemia e convulsões, sendo os neurônios particularmente sensíveis a esses efeitos (Sorrells *et al.*, 2009). Particularmente no SNC, os GCs aumentam o infiltrado de células inflamatórias (macrófagos, granulócitos e microglia) e a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-α e IL-1β após administração intra-hipocampal de ácido caínico (Dinkel *et al.*, 2003). Neste trabalho, os autores mostraram que e a morte neuronal observada foi diretamente proporcional ao infiltrado inflamatório. Desta maneira, resolvemos analisar se a exposição prévia a CORT era capaz de alterar os efeitos do LPS na viabilidade das células em cultura. Nossos resultados apontaram para um efeito neurotóxico da CORT apenas nas células de cultura mista expostas ao LPS. De maneira interessante, não foi observada uma curva dose-resposta clássica quando essas células foram expostas a diferentes concentrações de LPS, sugerindo uma resposta do tipo “tudo ou nada”, pois a diminuição da viabilidade nos grupos das culturas mistas foram em média 12% menor em relação aos seus respectivos controles.

5.3 LPS, Glicocorticoides e NFKB

Uma das ações anti-inflamatórias dos GCs se dá pela inibição direta ou indireta da ativação de fatores de transcrição, principalmente o NFKB. 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 o estímulo estressor e o desafio inflamatório (Frank *et al.*, 2010; MacPherson *et al.*, 2005). Neste sentindo, nosso laboratório mostrou que níveis elevados de GCs são capazes de potencializar a ativação do NFKB induzida por LPS sistêmico e que este efeito é dependente da ativação de GR (Munhoz *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostraram que células corticais de ratos neonatos são responsivas ao LPS quando analisada a ativação do NFKB, entretanto, neste modelo, a CORT não alterou a ativação de NFKB induzida por LPS, não impedindo-a e tampouco potencializando-a, como observado em modelo de cultura cortical mista com embriões de ratos (Munhoz, 2007). Uma das possíveis explicações pode residir na diferença quanto à expressão de receptores GR entre as culturas de embriões e a de neonatos (Pannasch *et al.*, 2011), também relatada no desenvolvimento do cérebro humano (Giaume, 2010; Johnson *et al.*, 2008). Outra possibilidade poderia ser um efeito-teto na ativação do NFKB induzida por LPS e, portanto, o efeito da CORT não poderia ser revelado. Nossas culturas foram mantidas em soro (10% SFB e 10% SC) durante seu crescimento e estes produtos apresentam níveis elevados de esteroides. Desta maneira, as células em cultura estariam expostas durante todo o seu desenvolvimento a níveis elevados de CORT, tornando as células não responsivas a alterações da concentração deste hormônio, um ponto bastante sensível para a revelação do seu efeito pró-inflamatório.

Já nas culturas enriquecidas de neurônios, o LPS não foi capaz de ativar o NFKB. Esse resultado também foi observado em cultura de embriões (Munhoz, 2007), sugerindo que ativação do NFKB induzida por LPS nas células corticais ocorre principalmente em células da glia. Nas células neuronais, a literatura descreve ativação constitutiva do NFKB em neurônios glutamatérgicos no hipocampo e córtex cerebral, como também em outras partes do cérebro, 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 (Kaltschmidt *et al.*, 2009)

Os GCs exercem seus efeitos através da ativação de seus receptores GR e MR. Devido à ausência de efeito da CORT na ativação do NFKB induzida por LPS nas células de cultura mistas, resolvemos analisar se a inibição dos GR, na presença de CORT, poderia resultar na modulação do NFKB pelo LPS em nosso modelo. Nossos resultados sugerem que existe, de fato, uma dependência da sinalização de GR na modulação da ativação de NFKB induzida por LPS quando CORT está presente. Na verdade, a inibição de GR revelou um possível efeito anti-inflamatório clássico da CORT, uma vez que o tratamento com RU486 foi capaz de potencializar a ativação de NFKB induzida por LPS nas células de cultura mistas pré-expostas ao hormônio. A ausência de efeito da CORT dificulta a interpretação desses resultados e não podemos excluir a participação dos MR nos efeitos observados. De fato, foi mostrado que o bloqueio dos GR pode exacerbar a ação dos MR também presentes (Patel *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010) e esses receptores são considerados mediarem as respostas neuroprotetoras da CORT, normalmente em condições fisiológicas. 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 dexametasona, um análogo sintético de GCs e agonista GR, enquanto que a administração do antagonista de MR, a espironolactona, aumenta o número de neurônios apoptóticos (Crochemore *et al.*, 2005). Um ensaio clínico em humanos com espironolactona e mifepristona (RU486, antagonistas GR), mostrou que o bloqueio de MR compromete a recuperação de memória, enquanto que o bloqueio de GR aumenta-a (Rimmele *et al.*, 2012). Entretanto, em uma abordagem diferente, Ogita et al., (2012) relataram uma ação pro-inflamatória de MR no hipocampo de camundongos injetados perifericamente com TMT (trimetilestanho), conhecido por causar degeneração neuronal. TMT concomitante com aldosterona ou mifepristona teve sua neurotoxicidade aumentada, enquanto que no tratamento concomitante com espironolactona, a neurotoxicidade do TMT foi reduzida (Ogita *et al.*, 2012). Esses trabalhos mostram, em sua maior parte, os efeitos opostos destes dois receptores, corroborando a teoria do balanço da ativação entre MR/GR ser essencial para o efeito final, que pressupõe que a ação conjunta de ambos leva a homeostase, enquanto que a ativação preferencial leva a patologia (Joels *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). O “desbalanço” entre os receptores no córtex pré-frontal e regiões hipotalâmicas vem sendo implicado como uma das causas da depressão maior em pacientes (Marin-Teva *et al.*, 2011).

Experimentos em voluntários humanos saudáveis também revelaram efeitos opostos entre os receptores. Este estudo mostrou que o pré-tratamento com cortisol em concentrações correspondentes a níveis basais, níveis moderados de estresse e níveis altos considerados farmacológicos, possuiu efeitos bifásicos frente ao estímulo inflamatório posterior com LPS. Em concentrações basais e farmacológicas, os GCs exerceram papel anti-inflamatório, e nas concentrações moderadas correspondentes a níveis de estresse, exerceram papel pró-inflamatório, analisado através do aumento da citocina IL-6 no plasma destes indivíduos após injeção de LPS (Yeager *et al.*, 2011).

5.4 NFKB e Tipos Celulares

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, 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 (Marin-Teva *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011). Desta maneira, devido à diferença de sensibilidade das células em culturas mistas e enriquecidas ao LPS e CORT, e devido às diferentes funções do NFKB nos diferentes tipos celulares, nosso próximo passo, foi verificar os papéis desempenhados por cada tipo celular, neurônios, microglia e astrócitos, nas diferentes respostas observadas nos modelos de cultura testados.

Nossos resultados mostraram um elevado padrão de localização nuclear da subunidade RELA do NFKB em neurônios, em torno de 55-60%, em ambos os modelos de culturas primárias corticais, independentemente dos estímulos dados (CORT e/ou LPS), apontando, de fato, para um papel constitutivo do NFKB neste tipo celular. O bloqueio de GR, pela adição de RU486, foi capaz de atenuar a localização nuclear de RELA em ambos os modelos de cultura, também independente dos tratamentos realizados. Esses resultados sugerem que o GR poderia participar da manutenção do RELA no núcleo de neurônios. Curiosamente, a localização nuclear de RELA em células neuronais não necessariamente se traduziu em aumento atividade do NFKB, já que pelos nossos resultados de EMSA, o qual mensura a ligação deste fator ao DNA, não observamos esse efeito.

Ao compararmos os dois modelos de cultura, a manutenção nuclear de RELA em células neuronais parece ser independente dos demais tipos celulares presentes (astrócitos e micróglia). Achados recentes da literatura evidenciam que os neurônios podem, de fato, participar ativamente da modulação da resposta inflamatória desencadeada pela microglia (Biber *et al.*, 2007; Boddeke *et al.*, 1999; Jurgens *et al.*, 2012). 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*" (Biber *et al.*, 2007; Boddeke *et al.*, 1999; Saijo *et al.*, 2011). Estes sinais podem ser físicos e depender do contato célula-célula, aumentado nas culturas enriquecidas de neurônios, como também podem ser fatores solúveis secretados por ambas as células, já que existem ligantes e receptores específicos nesses tipos celulares que se complementam (Boddeke *et al.*, 1999). Por exemplo, neurônios saudáveis expressam constitutivamente altos níveis da quimiocina CX3CL1 (quimiocina ligante 1 da CX3C), também conhecida como *fractalkine*, enquanto seu receptor, o CX3CR1, é expresso em microglia (Biber *et al.*, 2007). A ligação CX3CL1-CX3CR1 é protetora, uma vez que foi observada redução dose dependente da morte neuronal por inflamação induzida por LPS e INF-γ em co-culturas primárias de neurônios e microglia, derivadas de camundongos, expostas a concentrações crescentes de CX3CL1 (Mizuno *et al.*, 2003). Além disso, Boddeke et al., (1999) relataram que a expressão de CX3R1 em microglia é suprimida após exposição ao LPS de maneira tempo-dependente.

Os efeitos na localização nuclear de RELA na microglia são mais evidentes. Observamos forte localização nuclear na maioria das microglias em cultura (cerca de 80%) de ambos os modelos frente ao desafio inflamatório com LPS, independentemente do tratamento prévio com CORT. A microglia é o principal efetor da resposta imune no SNC e uma de suas principais funções é a de ser "vigilante" contra patógenos. Assim como as células imunes periféricas, ela tem a habilidade de migrar por grandes distâncias, proliferar e fagocitar. A microglia pode passar de um estado chamado de "repouso" e vigilância do ambiente, para "ativada", na vigência de um estímulo nocivo, como o LPS, que, como já mencionado, via TLR4 ativa o fator de transcrição NFKB, com consequente produção de mediadores pró-inflamatórios (Glezer *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2000; Kreutzberg, 1996; Marin-Teva *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011). Alguns autores classificam o estado de ativação da microglia em M1, neurotóxica, que produz mediadores pró-inflamatórios tais como TNFα, IL-1β e espécies reativas de oxigênio, e que estariam

relacionados com a progressão de doenças neurodegenerativas; e M2, neuroprotetora, com funções neurotróficas e de proteção, tais com secreção de fatores neurotróficos como IGF1, TGFβ e BDNF, e mediadores anti-inflamtórios como IL-4 e IL-10 (Marin-Teva *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011). O gatilho que desencadearia essa mudança de estado e função ainda não está muito bem descrito, mas há uma hipótese dele ser dependente do balanço final entre os mediadores pró- e anti-inflamatórios (Marin-Teva *et al.*, 2011; Saijo *et al.*, 2011).

Os GCs podem estar envolvidos nessa mudança de estado da microglia, limitando sua ativação, como relatado por Sugama et al., (2012). Estes autores mostraram que os camundongos *sham*, ou adrenalectomizados, submetidos ao estresse agudo (2h de imobilização em água), apresentaram microglias ativadas, sendo que nos adrenalectomizados, a ativação foi muito maior em 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 micróglia por estresse é negativamente regulada por CORT (Sugama *et al.*, 2012). Por outro lado, os GCs também podem sensibilizar a microglia, como relatado por De Pablos et al., (2006) em modelo de estresse crônico imprevisível de 9 dias consecutivos, seguido de desafio inflamatório com LPS intracerebroventricular em córtex pré-frontal de ratos. Esses autores observaram uma microglia ativada, em proliferação e com alta produção de TNFα, com consequente morte neuronal e astrocitária na região de aplicação, que foram reduzidos pelo tratamento com antagonista de GR (RU486) (de Pablos *et al.*, 2006), resultados estes semelhantes aos observados em nosso laboratório. Neste trabalho, não avaliamos o perfil de ativação das micróglias em cultura e nem a quais fenótipos, M1 ou M2, era o predominante nos diferentes modelos de cultura.

Frank et al., (2012) observaram o mesmo visto por de De Pablos (Frank *et al.*, 2012). Eles mostraram que a microglia do hipocampo de ratos adrenalectomizados ou tratados com RU486 submetidos ao estresse agudo e estimulada com LPS *ex vivo*, não tiveram a mesma resposta que a microglia de ratos controles ou *sham* submetidos às mesmas condições. Nestes últimos houve um aumento na produção de IL-1β, TNFα e IL-6, enquanto que nos adrenalectomizados e tratados com RU486, o mesmo não ocorreu (Frank *et al.*, 2012).

Nossos resultados também apontam para uma ação do GR microglial na manutenção dos níveis nucleares de RELA na vigência ou não de um estímulo inflamatório. Assim como para as células neuronais, esse efeito não pareceu ser dependente das interações celulares,

já que as microglias de culturas mistas se comportaram igual àquelas das culturas enriquecidas de neurônios.

Finalmente, enquanto os astrócitos ativados por LPS seguiram o mesmo padrão de localização nuclear da subunidade RELA do NFKB que a microglia nas culturas mistas de neurônios/células da glia, ficou evidente que a modulação por GR deste efeito, neste tipo celular, é dependente da interação entre os tipos celulares em cultura, diferente do que foi observado tanto para os neurônios quanto para as microglias. Vale a pena ressaltar que em nosso modelo de cultura, os astrócitos não expressaram o receptor TLR4 e mesmo assim foram extremamente responsivos ao LPS.

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 como verdadeiros protagonistas, necessários para a homeostase e sobrevivência neuronal (Giaume *et al.*, 2010; Magistretti, 2011; Volterra *et al.*, 2005). Desde a descoberta de receptores para neurotransmissores, os astrócitos foram alvo de intensa investigação e, desde então, novas funções tem sido dadas a essas células (Volterra *et al.*, 2005).

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 (Anderson *et al.*, 2000). 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 (Magistretti, 2011)).

Outras funções dos astrócitos incluem modulação atividade neuronal, controle da função e formação de sinapses, neurogênese e tônus vascular (Volterra *et al.*, 2005), além de regular o meio extracelular, como a concentração de K^+, por tamponamento espacial, parcialmente dependente de suas junções do tipo GAP (Wallraff *et al.*, 2006), como discutido anteriormente.

Os astrócitos são 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). 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 (Allaman *et al.*, 2011; Giaume *et al.*, 2010; Scemes *et al.*, 2012a). As conexinas, e também outras proteínas como as Panexinas (Panx), 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^+ (Scemes *et al.*, 2012b) Recentemente, Silverman et al., (2009) mostrou que um aumento na concentração extracelular de K^+, levou a abertura dos hemicanais de panexina e consequente ativação do inflamassoma e caspase-1 em neurônios e astrócitos de culturas primárias corticais de ratos (Silverman *et al.*, 2009), relatando um outro mecanismo pelo qual concentrações elevadas de K poderiam aumentar a toxicidade do LPS.

GCs e inflamação podem modular a função das GJC em astrócitos. . 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 GCJ e, portanto, diminuição na 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 (Sun *et al.*, 2012). O tratamento prolongado com LPS (>18 horas) também foi relatado como inibidor das Cx43 em astrócitos (Liao *et al.*, 2010).

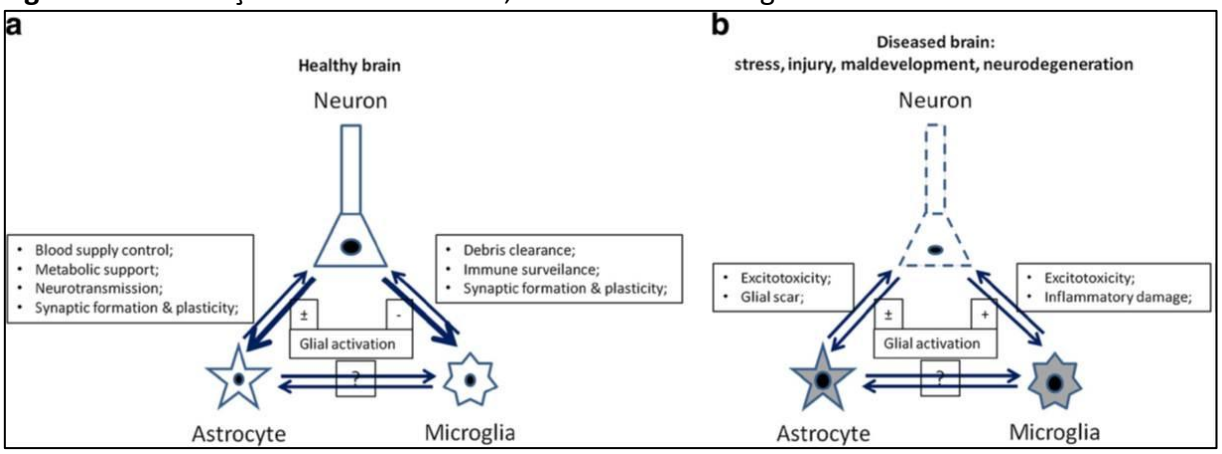
O papel das Cx43 em danos no SNC vem sendo estudado e atualmente existem duas vertentes conflitantes entre os efeitos neuroprotetores, como tamponamento, via dissipação entre as células, de substâncias potencialmente excitotóxicas após dano tecidual por isquemia; e os efeitos neurotóxicos, relacionadas à propagação de gradientes iônicos e morte neuronal (Chew *et al.*, 2010). Entretanto, não podemos afirmar se isto estaria ocorrendo nos astrócitos das culturas mistas aqui descritas e experimentos que confirmem tal informação precisam ser realizados.

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 astrocítico, resistindo a apoptose por ela induzida, a qual foi observada em neurônios (Yu *et al.*, 2011). 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 (Unemura *et al.*, 2012).

Além disso, a secreção de citocinas inflamatórias pela microglia pode modular e alterar as funções astrocitárias. Cultura de astrócitos tratadas com IL-1β ou TNF-α levam ao aumento da utilização de glicose 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 glutationa 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 astrocíticos (Gavillet *et al.*, 2008). 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 (Giaume *et al.*, 2010)). Não podemos afirmar se a morte celular observada nas culturas mistas tratadas com CORT e LPS seja decorrente da diminuição da função astrocitária induzida por CORT, que levaria a uma diminuição da viabilidade neuronal. Nossos resultados em astrócitos de culturas enriquecidas confirmam a dependência dessas células com os outros tipos celulares (neurônios e micróglia) e levantam algumas possibilidades. Por exemplo, que ocorre um acoplamento deficiente das GJC nos astrócitos, com diminuição da intercomunicação e consequente diminuição da resposta quanto à ativação e localização do NFKB, amplificada nas culturas mistas quando na presença de microglia. Ou ainda, os neurônios podem exercer modulação inibitória das microglias e consequente diminuição da resposta dos astrócitos. Ou ainda, que a diminuição somente da microglia poderia levar à diminuição da resposta astrocitária dependente de microglia (figura 6.1) (Holm *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2000).

Deste modo, podemos concluir que a interação dos astrócitos com os outros tipos celulares é importante para que essas células exerçam suas funções na modulação da resposta inflamatória induzida por LPS e na modulação da sinalização de GCs nessas condições. O mecanismo destas interações requer mais estudos e ainda está por ser elucidado.

Figura 6.1 - 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 (Tian *et al.*, 2012)

Em suma, nossos resultados corroboram dados da literatura que sugerem que os GCs não exercem somente ações anti-inflamatórias e que estas ações são específicas para cada tipo celular e suas interações em cada região encefálica. Além disso, nossos resultados apontam para uma ação dos GR na manutenção da localização nuclear da subunidade RELA NFKB, independente da vigência de um estímulo inflamatório, reforçando que a ativação deste fator nos diferentes tipos celulares pode resultar na amplitude das funções conhecidas do NFKB no SNC.

6 CONCLUSÃO

- O tratamento com LPS foi capaz de ativar o fator de transcrição NFKB em células de cultura mistas de neurônios/células da glia, mas não em células de culturas enriquecidas de neurônios.
- 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 NFKB induzida pelo LPS.
- Os neurônios não foram sensíveis ao LPS quanto à localização nuclear de RELA, contrariamente à microglias, no qual este fator estava fortemente presente no núcleo após estímulo com LPS. Em nenhum dos dois tipos celulares, a corticosterona foi capaz de diminuir estes efeitos e a sinalização via GR foi importante para a manutenção nuclear de RELA, independente da exposição à corticosterona ou LPS.

- As interações celulares não foram determinantes para a localização nuclear do RELA em microglia e neurônios, já que ambos responderam de forma idêntica a todos os tratamentos, independentemente se em culturas mistas ou enriquecidas.
- Apesar da possível falta de expressão de TLR4, os astrócitos se mostraram altamente responsivos ao LPS quanto à localização nuclear de RELA.
- A exposição ao antagonista de GR diminuiu a localização nuclear de RELA nos astrócitos, sugerindo uma ação pró-inflamatória dos GCs nesse tipo celular.
- As interações celulares são necessárias para a ação dos astrócitos uma vez que astrócitos de culturas enriquecidas foram menos sensíveis ao LPS do que os mesmos em culturas mistas.

REFERÊNCIAS*

Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E (2005). 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* **149**(2)**:** 110-120.

Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G (1997). Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol* **158**(1)**:** 438-445.

Akira S (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1579)**:** 2748-2755.

Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* **34**(2)**:** 76-87.

Allan SM, Rothwell NJ (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**(10)**:** 734-744.

Anderson CM, Swanson RA (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**(1)**:** 1-14.

Avila M, Gonzalez-Espinosa C (2011). Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *IUBMB Life* **63**(10)**:** 873-880.

Azmitia EC (1990). Microcultures of dissociated primary central nervous system neurons. In: Conn PM (ed)^(eds). *Cell Culture*, edn. San Diego: Academic Press. p^pp 263 - 275.

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D*, et al.* (2004). 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* **18**(1)**:** 70-80.

Behl C, Trapp T, Skutella T, Holsboer F (1997). Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death--a novel role for RU486. *Eur J Neurosci* **9**(5)**:** 912-920.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007). Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* **30**(11)**:** 596-602.

Boddeke EW, Meigel I, Frentzel S, Biber K, Renn LQ, Gebicke-Harter P (1999). Functional expression of the fractalkine (CX3C) receptor and its regulation by lipopolysaccharide in rat microglia. *Eur J Pharmacol* **374**(2)**:** 309-313.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:** 248-254.

Brewer GJ (1995). 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* **42**(5)**:** 674-683.

Brewer GJ, Torricelli JR (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc* **2**(6)**:** 1490-1498.

Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H (2010). Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem* **114**(1)**:** 13-27.

Busillo JM, Azzam KM, Cidlowski JA (2011). Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* **286**(44)**:** 38703-38713.

Busillo JM, Cidlowski JA (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*.

Camandola S, Mattson MP (2007). NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* **11**(2)**:** 123-132.

Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB*, et al.* (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21)**:** 10061-10065.

Cato AC, Wade E (1996). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* **18**(5)**:** 371-378.

Chang RC, Hudson PM, Wilson BC, Liu B, Abel H, Hong JS (2000). High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia-neuron mixed cultures. *Neuroscience* **97**(4)**:** 757-764.

Chew SS, Johnson CS, Green CR, Danesh-Meyer HV (2010). Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol* **225**(2)**:** 250-261.

Crochemore C, Lu J, Wu Y, Liposits Z, Sousa N, Holsboer F*, et al.* (2005). Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry* **10**(8)**:** 790-798.

Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992). 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* **89**(21)**:** 9991-9995.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* **24**(4)**:** 488-522.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2000). Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* **109**(1)**:** 16-22.

de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* **6**(6)**:** 463-475.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* **19**(3)**:** 269-301.

de Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A*, et al.* (2006). Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* **26**(21)**:** 5709-5719.

Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM (2003). Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J Neurochem* **84**(4)**:** 705-716.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**(9)**:** 391-397.

Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998). The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* **5**(3-4)**:** 143-159.

Floyd RA (1999). 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* **26**(9-10)**:** 1346-1355.

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

Frank MG, Thompson BM, Watkins LR, Maier SF (2012). Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses. *Brain Behav Immun* **26**(2)**:** 337-345.

Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP (1998). Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(12)**:** 1283-1287.

Gavillet M, Allaman I, Magistretti PJ (2008). Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* **56**(9)**:** 975-989.

Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ*, et al.* (2001). Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem* **78**(2)**:** 265-275.

Getting SJ, Flower RJ, Perretti M (1997). Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol* **120**(6)**:** 1075-1082.

Ghosh S, Karin M (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl:** S81-96.

Giaume C (2010). Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front Neuroenergetics* **2**.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* **11**(2)**:** 87-99.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**(6)**:** 918-934.

Glezer I, Simard AR, Rivest S (2007). Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **147**(4)**:** 867-883.

Gomez-Sanchez EP (2010). The mammalian mineralocorticoid receptor: tying down a promiscuous receptor. *Experimental physiology* **95**(1)**:** 13-18.

Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **22:** 219-240.

Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T (2012). Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology* **33**(7)**:** 333-342.

Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA (2012). Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol* **13**(4)**:** 321-324.

Holm TH, Draeby D, Owens T (2012). Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* **60**(4)**:** 630-638.

Joels M, de Kloet ER (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* **43**(1)**:** 1-36.

Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* **31**(1)**:** 1-7.

John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung MH, Biddie SC, Johnson TA*, et al.* (2011). Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nature genetics* **43**(3)**:** 264-268.

Johnson RF, Rennie N, Murphy V, Zakar T, Clifton V, Smith R (2008). Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(12)**:** 4887-4893.

Jung DY, Lee H, Jung BY, Ock J, Lee MS, Lee WH*, et al.* (2005). TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol* **174**(10)**:** 6467-6476.

Jurgens HA, Johnson RW (2012). Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol* **233**(1)**:** 40-48.

Kaal EC, Vecht CJ (2004). The management of brain edema in brain tumors. *Curr Opin Oncol* **16**(6)**:** 593-600.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009). NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(3)**:** a001271.

Kaltschmidt B, Linker RA, Deng J, Kaltschmidt C (2002). Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC Mol Biol* **3**(1)**:** 16.

Karin M, Chang L (2001). AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol* **169**(3)**:** 447-451.

Kauppi B, Jakob C, Farnegardh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M*, et al.* (2003). The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem* **278**(25)**:** 22748-22754.

Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* **20**(16)**:** 6309-6316.

Kivell BM, McDonald FJ, Miller JH (2000). Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **120**(2)**:** 199-210.

Kolber BJ, Wieczorek L, Muglia LJ (2008). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. *Stress* **11**(5)**:** 321-338.

Kreutzberg GW (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**(8)**:** 312-318.

Lee MS, Choi HS, Kwon SH, Morita K, Her S (2009). Identification of the functional domain of glucocorticoid receptor involved in RU486 antagonism. *J Steroid Biochem Mol Biol* **117**(1-3)**:** 67-73.

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA*, et al.* (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14)**:** 8514-8519.

Lesuisse C, Martin LJ (2002a). Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**(8)**:** 935-950.

Lesuisse C, Martin LJ (2002b). Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J Neurobiol* **51**(1)**:** 9-23.

Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA (2007). Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol* **27**(6)**:** 2266-2282.

Li MD, Yang X (2011). A Retrospective on Nuclear Receptor Regulation of Inflammation: Lessons from GR and PPARs. *PPAR research* **2011:** 742785.

Liao CK, Wang SM, Chen YL, Wang HS, Wu JC (2010). Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(5)**:** 762-770.

Ligr M, Li Y, Logan SK, Taneja S, Melamed J, Lepor H*, et al.* (2012). Mifepristone inhibits GRbeta coupled prostate cancer cell proliferation. *J Urol* **188**(3)**:** 981-988.

Ling Z, Zhu Y, Tong C, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM (2006). Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. *Exp Neurol* **199**(2)**:** 499-512.

MacPherson A, Dinkel K, Sapolsky R (2005). Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. *Exp Neurol* **194**(2)**:** 376-383.

Magistretti PJ (2011). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Experimental physiology* **96**(4)**:** 407-410.

Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J (2011). Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* **7**(1)**:** 25-40.

McEown K, Treit D (2011). Mineralocorticoid receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediate rats' unconditioned fear behaviour. *Horm Behav* **60**(5)**:** 581-588.

McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* **66**(4)**:** 1121-1188.

McKay LI, Cidlowski JA (2000). CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol* **14**(8)**:** 1222-1234.

Medzhitov R (2010a). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**(6)**:** 771-776.

Medzhitov R (2010b). Innate immunity: quo vadis? *Nat Immunol* **11**(7)**:** 551-553.

Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**(7203)**:** 428-435.

Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* **324**(5925)**:** 407-410.

Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A (2003). Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* **979**(1-2)**:** 65-70.

Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC*, et al.* (2006). Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* **26**(14)**:** 3813-3820.

Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci* **30**(41)**:** 13690-13698.

Munhoz CDea (2007). Glucocorticoids (GCs) potentiate LPS-induced inflammatory response in frontal cortex by changing the expression of anti and pro-inflammatory genes. In: *Society for Neuroscience*.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* **3**(3)**:** 216-227.

Nixon M, Andrew R, Chapman KE (2013). It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids* **78**(1)**:** 59-68.

Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H*, et al.* (2007). 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* **148**(2)**:** 627-637.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**(17)**:** 5421-5426.

O'Callaghan JP, Sriram K, Miller DB (2008). Defining "neuroinflammation". *Ann N Y Acad Sci* **1139:** 318-330.

Oakley RH, Cidlowski JA (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* **286**(5)**:** 3177-3184.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011). Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* **12**(8)**:** 695-708.

Ogita K, Sugiyama C, Acosta GB, Kuramoto N, Shuto M, Yoneyama M*, et al.* (2012). Opposing roles of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor in trimethyltin-induced cytotoxicity in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett* **511**(2)**:** 116-119.

Palm NW, Medzhitov R (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* **227**(1)**:** 221-233.

Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C*, et al.* (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(20)**:** 8467-8472.

Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(4)**:** E197-205.

Patel PD, Katz M, Karssen AM, Lyons DM (2008). Stress-induced changes in corticosteroid receptor expression in primate hippocampus and prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology* **33**(3)**:** 360-367.

Piccioli P, Porcile C, Stanzione S, Bisaglia M, Bajetto A, Bonavia R*, et al.* (2001). Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* **66**(6)**:** 1064-1073.

Pruett SB, Fan R, Zheng Q (2003). Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmic IkappaB, nuclear NFkappaB, and activation of NFkappaB in T lymphocytes exposed to stress-inducible concentrations of corticosterone in vivo. *Int Immunopharmacol* **3**(1)**:** 1-16.

Quan N, He L, Lai W, Shen T, Herkenham M (2000). Induction of IkappaBalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. *J Neurosci* **20**(17)**:** 6473-6477.

Rimmele U, Besedovsky L, Lange T, Born J (2012). Blocking Mineralocorticoid Receptors Impairs, Blocking Glucocorticoid Receptors Enhances Memory Retrieval in Humans. *Neuropsychopharmacology*.

Sabban EL, Kvetnansky R (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci* **24**(2)**:** 91-98.

Saijo K, Crotti A, Glass CK (2013). Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia* **61**(1)**:** 104-111.

Saijo K, Glass CK (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* **11**(11)**:** 775-787.

Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG*, et al.* (2009). A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* **137**(1)**:** 47-59.

Scemes E, Spray DC (2012a). Extracellular K(+) and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochemical research*.

Scemes E, Spray DC (2012b). Extracellular K(+) and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochemical research* **37**(11)**:** 2310-2316.

Schweingruber N, Reichardt SD, Luhder F, Reichardt HM (2012). Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* **24**(1)**:** 174-182.

Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA*, et al.* (1999). 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* **254**(3)**:** 559-565.

Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K (2008). Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* **56**(6)**:** 659-674.

Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E*, et al.* (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* **284**(27)**:** 18143-18151.

Smoak KA, Cidlowski JA (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* **125**(10-11)**:** 697-706.

Somjen GG (2002). Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist* **8**(3)**:** 254-267.

Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* **64**(1)**:** 33-39.

Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH (2000). Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* **105**(5)**:** 943-950.

Strober W (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 3:** Appendix 3B.

Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**(7381)**:** 278-286.

Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Conti B, Hashimoto M (2012). Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. *Neuroscience* **232C:** 13-20.

Sun JD, Liu Y, Yuan YH, Li J, Chen NH (2012). Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* **37**(5)**:** 1305-1320.

Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG*, et al.* (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(34)**:** 13798-13803.

Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A*, et al.* (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* **213**(1)**:** 114-121.

Thompson C, Gary D, Mattson M, Mackenzie A, Robertson GS (2004). Kainic acid-induced naip expression in the hippocampus is blocked in mice lacking TNF receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **123**(1-2)**:** 126-131.

Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z (2012). Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation* **9:** 155.

Tolosa E, Ashwell JD (1999). Thymus-derived glucocorticoids and the regulation of antigen-specific T-cell development. *Neuroimmunomodulation* **6**(1-2)**:** 90-96.

Unemura K, Kume T, Kondo M, Maeda Y, Izumi Y, Akaike A (2012). Glucocorticoids decrease astrocyte numbers by reducing glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci* **119**(1)**:** 30-39.

Unlap MT, Jope RS (1997). Dexamethasone attenuates NF-kappa B DNA binding activity without inducing I kappa B levels in rat brain in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* **45**(1)**:** 83-89.

Velasco I, Velasco-Velazquez MA, Salazar P, Lajud N, Tapia R (2003). Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **71**(6)**:** 811-818.

Volterra A, Meldolesi J (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**(8)**:** 626-640.

Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* **26**(20)**:** 5438-5447.

Wang Q, Gong Q, Wu Q, Shi J (2010). Neuroprotective effects of Dendrobium alkaloids on rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Phytomedicine* **17**(2)**:** 108-115.

Weber CM, Eke BC, Maines MD (1994). Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J Neurochem* **63**(3)**:** 953-962.

Whitehead D, Carter DA (1997). cAMP response element-binding protein phosphorylation and DNA binding activity are increased in the anterior pituitary gland following glucocorticoid depletion. *J Mol Endocrinol* **19**(3)**:** 291-297.

Wyss-Coray T, Mucke L (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* **35**(3)**:** 419-432.

Xie C, Markesbery WR, Lovell MA (2000). Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. *Free Radic Biol Med* **28**(5)**:** 665-672.

Yang CS, Shin DM, Jo EK (2012). The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *International neurourology journal* **16**(1)**:** 2-12.

Yeager MP, Pioli PA, Guyre PM (2011). Cortisol exerts bi-phasic regulation of inflammation in humans. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society* **9**(3)**:** 332-347.

Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A*, et al.* (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* **21**(11)**:** 3740-3748.

Yu S, Patchev AV, Wu Y, Lu J, Holsboer F, Zhang JZ*, et al.* (2010). Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids. *Ann Neurol* **67**(1)**:** 21-30.

Yu S, Yang S, Holsboer F, Sousa N, Almeida OF (2011). Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function. *PLoS One* **6**(7)**:** e22419.