

**PAULO CÉSAR FERREIRA DOS SANTOS**

**Efeito do acionamento do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR) na interação  
astrócito-micróglia em modelo inflamatório *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2022

**PAULO CÉSAR FERREIRA DOS SANTOS**

**Efeito do acionamento do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR) na interação  
astrócito-micróglia em modelo inflamatório *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso

Versão Original

São Paulo  
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Paulo César Ferreira dos Santos

Titulo da Tese: Efeito do acionamento do receptor  $\beta_2$ -adrenergico ( $\beta_2$ AR) na interação astrócito-micróglia em modelo inflamatório *in vitro*

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a):      Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a):      Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a):      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel dos receptores Beta2-adrenergicos (beta2AR) de astrócitos no curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)*", registrado sob o protocolo nº **6/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/04/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Niels Olsen Saraiva Camara**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Paulo César Ferreira dos Santos (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Role of astrocyte beta2-adrenergic receptor (beta2AR) at the course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)*", protocol nº **6/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/14/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

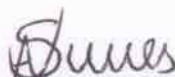
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Niels Olsen Saraiva Camara**

- Team members: *Paulo César Ferreira dos Santos (Graduate Student)*.

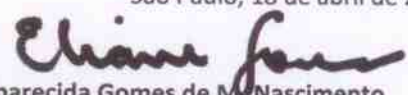
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6 Adrb2ff	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	50
	C57BL/6 GFAP-Cre	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	50
	C57BL/6 GFAP-Cre/adrb2ff	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	50
	C57BL/6 Adrb2ff	Macho/male	6-8 semanas/weeks	6
	C57BL/6 b2AR -/-		Neonato	50
	C57BL/6		Neonato	100

São Paulo, 18 de abril de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretário CEUA-ICB/USP



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel dos receptores Beta2-adrenergicos (Beta2AR) de astrócitos no curso da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)", protocolada sob o CEUA nº 2872270317, sob a responsabilidade de **Paulo César Ferreira dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 19/05/2017.

We certify that the proposal "Role of astrocyte Beta2-adrenergic receptor (Beta2AR) at the course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)", utilizing Isogenics mice, Knockout mice, Transgenics mice, protocol number CEUA 2872270317, under the responsibility of **Paulo César Ferreira dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/19/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2017](#) a [04/2021](#)

Área: [Imunologia/microbiologia, Imunologia E Parasitologia](#)

Origem:	<a href="#">Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos isogênicos</a>	sexo: <a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 3 dias</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6</a>		Peso: <a href="#">5 a 10 g</a>
Origem:	<a href="#">Biotério da Disciplina de Imunologia (BiDI)</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos Knockout</a>	sexo: <a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 3 dias</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6 B2AR -/-</a>		Peso: <a href="#">5 a 10 g</a>
Origem:	<a href="#">Biotério da Disciplina de Imunologia (BiDI)</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos transgênicos</a>	sexo: <a href="#">Fêmeas</a>	idade: <a href="#">6 a 8 semanas</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6 GFAP-Cre</a>		Peso: <a href="#">25 a 30 g</a>
Origem:	<a href="#">Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos transgênicos</a>	sexo: <a href="#">Fêmeas</a>	idade: <a href="#">6 a 8 semanas</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6 Adrb2ff</a>		Peso: <a href="#">25 a 30 g</a>
Origem:	<a href="#">Biotério da Disciplina de Imunologia (BiDI)</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos transgênicos</a>	sexo: <a href="#">Fêmeas</a>	idade: <a href="#">6 a 8 semanas</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6 GFAP-Cre/Adrb2ff</a>		Peso: <a href="#">25 a 30 g</a>
Origem:	<a href="#">Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME</a>		
Espécie:	<a href="#">Camundongos transgênicos</a>	sexo: <a href="#">Machos</a>	idade: <a href="#">6 a 8 semanas</a> N: <a href="#">---</a>
Linhagem:	<a href="#">C57BL/6 Adrb2ff</a>		Peso: <a href="#">25 a 30 g</a>

Local do experimento: Os experimentos serão realizados nas dependências do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, sobretudo na Disciplina de Imunologia, no 4º andar do Edifício de Ciências Biomédicas, em seu biotério, sala de cultura e Laboratório de Neuroimunologia, esse último sob responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso.

São Paulo, 24 de outubro de 2018

# *Comissão de Ética no Uso de Animais*



Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais e a meu irmão, por quem tenho amor eterno, como realização de um sonho feito há quatro cabeças e um só coração. E ao meu marido, Leonardo, com quem sonho acordado todos os dias em que construímos nossa linda família.

## AGRADECIMENTOS

Dizer que uma obra de arte é de responsabilidade de apenas um artista é ignorar todas as influências que este teve por toda a sua jornada até aquele momento. Assim, espero que todos aqueles que se sentem especiais pelo nosso convívio compartilhem de toda a alegria desta realização a qual me dediquei enormemente. A todos vocês, o meu muito obrigado por contribuições tão edificantes.

Hoje, eu agradeço primeiramente a força Divina que, mesmo invisível, se manifesta em todas as coisas que me rodeiam, cada uma dotada de imensa sabedoria, delicadeza e ensinamento. Agradeço, sobretudo, por poder perceber que Ele estava em todos os momentos comigo durante essa longa caminhada e que nunca estive desamparado de Seu amor quando as vezes duvidava até de mim.

Agradeço a todos os professores e mentores que passaram por minha carreira acadêmica, hoje se manifestando na atuação do Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso. As oportunidades criadas por todos vocês, a inquietação científica e a paixão pelo que se faz me incentivou sempre a ir mais longe, apesar das adversidades. Em especial, durante o doutorado, tenho muita gratidão por ter tido como orientador alguém que não se limita aos deveres burocráticos, tendo sempre um olhar muito humano e acolhedor.

Aos amigos da Disciplina de Imunologia da UNIFESP, agradeço por terem sido companheiros de inúmeras batalhas, dividir as alegrias e as lágrimas por todos os experimentos que fazíamos. A vida acadêmica pode ser muito solitária e egoísta, mas a presença de vocês em todos os momentos que não se resumem tão somente a bancada fez com que mesmo os inúmeros resultados “negativos” tivessem um brilho diferente.

Aos meus amigos do Laboratório de Neuroimunologia (Beatriz, Felipi, Joyce, Edson e Marcia), muito obrigado por terem compartilhado momentos tão enriquecedores de discussão e de apoio para a realização deste projeto. Desenvolvemos relações duradouras e de grande importância afetiva.

Agradeço também a todos os funcionários e técnicos da USP e UNIFESP, em especial aos da Disciplina de Imunologia. A atuação de vocês foi e é



essencial para o ótimo funcionamento de toda a estrutura que precisamos para nossos projetos.

Aos amigos feitos em Uberlândia (Iara, Ianna, Douglas, Manoela, Alessandra, Cínthia, Ana Luiza, Igor) por serem os melhores amigos que um dia eu pude conhecer. A distância física, seja grande ou não, jamais afastará nossos corações.

Aos amigos feitos dentro das quadras de vôlei, saibam que eu levo cada um de vocês em um lugar muito especial. A prática desse esporte que sempre gostei muito se tornou momento de terapia coletiva. Sem vocês, eu não sei se teria chegado até o fim. Muito obrigado.

Aos novos amigos de caminhada da pesquisa clínica, agradeço por ajudarem a manter acesa a chama da realização do bem ao próximo. Participar desses processos onde o paciente é nosso receptor final de tanto conhecimento produzido em laboratórios e universidades justifica tantos anos de estudo e de dedicação de milhares de entusiastas em ciência espalhados pelo mundo. Muito obrigado pelo afeto a mim dedicado em tantos momentos, sobretudo na acolhida nessa nova jornada, e por me fazer perceber que a pesquisa clínica é, antes de tudo, um exercício de humanidade e de comprometimento com o outro. Como vocês sabem, conciliar essa jornada dupla não foi fácil, mas atuar nessa área fazia com que eu quisesse que esse trabalho fosse concluído ainda mais, pra que de alguma forma, eu pudesse contribuir, quem sabe, com o entendimento de algumas doenças no futuro e ajudar na qualidade de vida de pessoas com esses males. O sonho é grande, mas se não for pra ter sonhos desse tamanho, é melhor nem sonhar.

Ao meu marido Leonardo, que chegou na parte final e mais turbulenta desta jornada e suportou todas as minhas crises e dramas com resiliência, sempre me ajudando a permanecer no caminho quando eu ousava em ser errante. Não poderia ser mais feliz ao lado de alguém. A nossa família, por hora composta por nós e por nossas duas filhas felinas (Victória e Luna) é pra quem/onde eu sempre quero voltar. Muito obrigado por tudo. Amo você(s).

Por fim, agradeço a minha família. A certeza de que “o estudo é transformador” é um ideal que sempre foi muito trabalhado dentro do meu lar desde muito cedo. Junto com ele, os valores morais e de amor ao próximo sempre estiverem muito presentes. Assim, começamos a caminhada sendo 4

cabeças e um só coração. As vezes eram tantas cabeças que elas acabavam se chocando. Era inevitável. Mas essa proximidade de cabeças facilita também a percepção da melodia que nos faz viver: dava pra ouvir o coração batendo num só ritmo. Agradeço pelas escolhas feitas por mim quando eu ainda não podia ou não tinha a maturidade necessária para cada uma delas. Sigo hoje com a angustia da escolha, mas com a clareza de que tive bons alicerces para seguir no caminho do bem e do progresso. A minha mãe, Eliane, ao meu irmão, Marco Túlio, obrigado por tudo e por SEMPRE segurarem a minha mão até aqui. Meu pai, Marco Paulo, se tornou luz há alguns anos e segue nos olhando. Tenho certeza que, de onde quer que ele esteja, hoje também está em festa, porque seu sonho de ver os filhos doutores está se realizando. Faltam palavras pra agradecer e externalizar o tamanho da minha gratidão a vocês três. Não sei mais o que dizer, apenas sentir. Amo muito vocês. Ontem, hoje e sempre, somos 4.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroimunologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso. O presente projeto recebeu auxílio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

“Aí, maloqueiro! Aí, maloqueira!  
Levanta essa cabeça  
Enxuga essas lágrimas, certo? (Você memo')  
Respira fundo e volta pro ringue (Vai)  
Cê vai sair dessa prisão  
Cê vai atrás desse diploma  
Com a fúria da beleza do sol, entendeu?  
Faz isso por nóiz  
Faz essa por nóiz (Vai)  
Te vejo no pódio”

Emicida

Santos, P. C. F. Efeito do acionamento do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR) na interação astrócito-micróglia em modelo inflamatório *in vitro*. [tese (Doutorado em Imunologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

Astrócitos são importantes células gliais que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do Sistema Nervoso Central. Além disso, astrócitos também participam do processo inflamatório que ocorre em doenças como Parkinson, acidente vascular cerebral e Esclerose Múltipla (EM). Nosso grupo está interessado em entender se e como a sinalização pelo receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR) pode interferir na função dos astrócitos diante de estímulos inflamatórios. Neste trabalho, apresentamos dados que demonstram que a ativação do  $\beta_2$ AR em uma cultura enriquecida de astrócitos regula negativamente a produção induzida por LPS de CCL2 e TNF- $\alpha$  de maneira independente de PKA. Além disso, demonstramos que astrócitos purificados regulam positivamente a expressão de *Ccl2*, *Tnf-a*, *NOS2* e *Il-10* quando tratados com meio condicionado de microglias estimuladas por LPS (MCM, usado como estímulo), em contraste com o controle (não tratado) MCM. E que o pré-tratamento com Fenoterol (agonista  $\beta_2$ AR) é capaz de induzir uma regulação positiva de *Il-10* e uma regulação negativa da expressão de *Ccl2*, *Tnf-a* e *NOS2* em astrócitos. Ademais, a ativação de  $\beta_2$ AR em astrócitos ou na micróglia estimulada por LPS reduziu os níveis de CCL2 detectados por ELISA no sobrenadante de astrócitos estimulados com o MCM. Também descrevemos que a sinalização pelo  $\beta_2$ AR reduz a produção de TNF- $\alpha$  por culturas de microglia estimuladas por LPS. Descrevemos também que o uso de um anticorpo bloqueador anti-TNF- $\alpha$  em estímulos de MCM reverte parcialmente o efeito de LPS-MCM na secreção de CCL2 por astrócitos purificados. Demonstramos que o uso do antagonista  $\beta_2$ AR e H89 reverte total e parcialmente, respectivamente, a fosforilação de CREB induzida pelo Fenoterol. Em conclusão, nossos resultados indicam que a interação micróglia-astrócitos desempenha importante papel no microambiente inflamatório, especialmente na secreção de TNF- $\alpha$  pela micróglia, que induz a expressão de importantes citocinas e quimiocinas nos astrócitos. Além disso, nossos resultados demonstram que a sinalização por

$\beta_2$ AR regula negativamente o efeito pró-inflamatório da microglia nos astrócitos e na microglia diretamente.

**Palavras-chave:** Astrócito. Microglia.  $\beta_2$ AR. LPS. TNF- $\alpha$ .

Santos, P. C. F. Role of the  $\beta_2$ -adrenergic Receptor ( $\beta_2$ AR) on the astrocyte-microglia interaction in in vivo inflammatory model. Ph.D thesis [(Department of Immunology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

Astrocytes are important glial cells that play a key role in maintaining CNS homeostasis. In addition, astrocytes also participate in the inflammatory process that occurs in diseases such as Parkinson's, stroke and Multiple Sclerosis (MS). Our group is interested in understanding whether and how  $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ AR) signaling can interfere with astrocyte function in during inflammatory stimuli. In this work, we present data demonstrating that activation of  $\beta_2$ AR in an enriched culture of astrocytes downregulates the LPS-induced production of CCL2 and TNF- $\alpha$  in a PKA-independent manner. Furthermore, we demonstrated that purified astrocytes upregulate the expression of *Ccl2*, *Tnf-a*, *NOS2* and *Il-10* when treated with LPS-stimulated microglia conditioned medium (MCM, used as stimulus), in contrast to the control (untreated) MCM. And that pretreatment with Fenoterol ( $\beta_2$ AR agonist) is capable of inducing an up-regulation of *Il-10* and a down-regulation of the expression of *Ccl2*, *Tnf-a* and *NOS2* in astrocytes. Furthermore, activation of  $\beta_2$ AR in astrocytes or in microglia stimulated by LPS reduced the levels of CCL2 detected by ELISA in the supernatant of astrocytes stimulated with MCM. We also describe that  $\beta_2$ AR signaling reduces TNF- $\alpha$  production by LPS-stimulated microglia cultures. We also describe that the use of a blocking anti-TNF- $\alpha$  antibody in MCM stimuli partially reverses the effect of LPS-MCM on the secretion of purified astrocytes of CCL2 and TNF- $\alpha$ . We demonstrated that the use of  $\beta_2$ AR and H89 antagonists totally and partially reversed, respectively, Fenoterol-induced CREB phosphorylation. In conclusion, our results indicate that the microglia-astrocyte interaction plays an important role in the inflammatory microenvironment, especially in the secretion of TNF- $\alpha$  by the microglia, which induces the expression of important cytokines and chemokines in astrocytes. Furthermore, our results demonstrate that the  $\beta_2$ AR trigger down-regulates the pro-inflammatory effect of microglia on astrocytes and microglia directly.

**Keywords:** Astrocyte. Microglia.  $\beta_2$ AR. LPS. TNF- $\alpha$ .

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais .....	41
<b>Figura 2 –</b>	Curva de produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente ao desafio de LPS .....	42
<b>Figura 3 –</b>	Produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente a ativação de $\beta_2$ AR com fenoterol e desafio de LPS .....	44
<b>Figura 4 –</b>	Produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente a ativação de $\beta_2$ AR por Noradrenalina e desafio de LPS .....	45
<b>Figura 18 –</b>	Esquema de interação micróglia-astrócito durante indução inflamatória in vitro por LPS e modulação por acionamento do $\beta_2$ AR .....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

“ACTH” – hormônio adrenocorticotrófico

“AP-1” – proteína ativadora 1

“APC” – célula apresentadora de antígeno

“AQP4” – aquaporina 4

“BMP” – do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*

“cAMP” – adenosina monofosfato cíclico

“CD” – do inglês, *Cluster of differentiation*

“CEUA” – Comitê de Ética no Uso de Animais

“CFA” – adjuvante completo de Freud

“CONCEA” – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

“CRF” – fator liberador de corticotrofina

“DAMP” – do inglês, *Damage-associated Molecular Pattern*

“DAPI” – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

“DMEM” – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

“DNA” – ácido desoxiribuncléico

“EAE” – Encefalomielite Autoimune Experimental

“EM” – Esclerose Múltipla

“GFAP” – do inglês, *Glial Fibrillar Acid Protein*

“GPCR” – do inglês, *G protein coupled receptor*

“G<sub>αs</sub>” – proteína G estimulante

“HEPES” – do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

“IFN-γ” – interferon gamma

“IL” – interleucina

“I $\kappa$ B $\alpha$ ” – do inglês, *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

“KIR” – do inglês, *Inwardly rectifying K<sup>+</sup>*

“LIF” – do inglês, *Leukemia Inhibitor Factor*

“LPS” – lipopolissacarídeo

“MBP” – proteína básica de mielina

“MHC-II” – complexo principal de histocompatibilidade de classe II

“MOG” – glicoproteína mielínica de oligodendrócitos

“MS” – do inglês, *Multiple Sclerosis*

“NF- $\kappa$ B” – do inglês, *Nuclear Factor kappa B*

“PAMP” – do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

“PBS” – do inglês, *Phosphate buffered saline*

“PFA” – paraformol aldeído

“PKA” – proteína quinase A

“PLP” – proteína proteolípica

“PRR” – do inglês, *Pattern-Recognition Receptors*

“SNC” – Sistema Nervoso Central

“SNS” – Sistema Nervoso Simpático

“Th” – do inglês, *T helper*

“TLR” – do inglês, *Toll-like Receptor*

“TNF- $\alpha$ ” – fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 <i>Astrócitos</i> .....	21
1.1.1 Origem e funções .....	21
1.1.2 Astrócitos e a neuropatologia.....	23
1.2 <i>Micróglia</i> .....	25
1.2.1 Origem e Funções.....	25
1.2.2 Micróglias e Neuropatologia.....	26
1.3 <i>Interação astrócito-micróglia</i> .....	27
1.4 <i>O sistema nervoso e o sistema imune</i> .....	29
1.4.1 O receptor $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR).....	30
1.5 <i>O <math>\beta_2</math>AR e a interação astrócitos-micróglia</i> .....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	33
2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	33
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1 <i>Aspectos éticos</i> .....	34
3.2 <i>Cultura enriquecida de astrócitos</i> .....	34
3.3 <i>Ensaio ex-vivo</i> .....	35
3.3.1 Pureza da cultura celular.....	35
3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI.....	35
3.3.3 Citometria de Fluxo.....	36
3.3.4 Produção de citocinas.....	37
3.3.5 Análise de ativação de via de sinalização.....	37
3.4 <i>Estatística</i> .....	39
<b>4 RESULTADOS</b> .....	40
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso é formado basicamente por neurônios e células da glia, sendo que este último pode compor até 50% das células que compõe todo o sistema. (1). Entre as células da glia, estão os oligodendrócitos, importantes na composição da bainha de mielina (2), astrócitos, mais abundantes e heterogêneos (3), e as micróglias, com origem e funções semelhantes a macrófagos (4).

### 1.1 *Astrócitos*

#### 1.1.1 Origem e funções

Astrócitos são derivados da diferenciação de uma camada única de células comuns a neurônios e oligodendrócitos (5). Esta diferenciação envolve principalmente as vias de JAK-STAT e de LIF (6). Outros fatores são importantes para que ocorra a astrogliogênese, como a interação de BMP com o próprio LIF, desencadeando a expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador característico de astrócitos (5, 7, 8).

Astrócitos podem ser divididos quanto a sua morfologia e localização em dois grandes grupos: os protoplasmáticos, dispersos por toda a matéria cinzenta e com ramificações abundantes, e; os fibrosos, encontrados na matéria branca, com aspectos que se assemelham a fibras e sem tantas ramificações (9, 10).

Astrócitos são o tipo celular mais abundante do SNC, não existindo sequer uma região do mesmo em que não sejam encontrados, formando uma rede não-sobreposta que é essencial para o desempenho de várias e importantes funções (11-16). Esse tipo celular é capaz de formar associações entre si por meio de junções do tipo GAP que garantem a passagem de várias moléculas, tais como íons de  $K^+$   $Ca^+$  e neurotransmissores, como o glutamato (17).

Em se tratando de íons, astrócitos apresentam receptores e canais iônicos diversos, tão vastos quanto os próprios neurônios, e de suma importância para a sua função de controle de íons presentes no estroma do SNC (13, 18). O funcionamento de canais como KIR e aquaporina 4 (AQP4) garantem o controle iônico do SNC, indispensável para o equilíbrio e bom funcionamento do órgão

(19). A presença de canais de sódio e potássio em astrócitos evidencia seu potencial de membrana e aumento de corrente elétrica mesmo que incapaz de deflagrar esse potencial de forma ordenada como os neurônios, mas não menos importante para a comunicação entre estes tipos celulares (13, 17).

Durante a ontogênese do SN, astrócitos participam da formação das ligações entre os neurônios (sinapses) por meio da liberação de moléculas sinalizadoras que podem tanto orientar os prolongamentos dos neurônios, ou auxiliar na poda sináptica através da indução de C1q, suscetível a ação de micróglias (14, 20-23). Ainda relacionado a função dos astrócitos, este tipo celular participa ativamente do sequestro de glutamato da fenda sináptica após a passagem do impulso nervoso de um neurônio para o próximo, processo essencial no SNC (24). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante em todo o SNC, além de ser também uma neurotoxina dependendo das suas concentrações (25). Assim, a sua retirada da fenda sináptica, ou do meio extracelular em geral, evita eventual hiperativação dos receptores glutamatérgicos em neurônios, o que pode causar morte celular em função do grande influxo de cálcio. Os astrócitos são uma das células do SNC que contém os transportadores de glutamato e o tipo celular que consegue retirar mais deste neurotransmissor do sistema, quantitativamente (24).

Além do sequestro de glutamato e de redistribuir essas quantidades pelo órgão, astrócitos são responsáveis também pela reposição do neurotransmissor aos neurônios (26). Os astrócitos apresentam a enzima glutamina sintetase, a qual, junto com amônia, converte glutamato em glutamina, só então capaz de ser absorvida pelos neurônios, os quais a utilizam para síntese do glutamato (27, 28).

Astrócitos são também muito importantes para a manutenção da barreira hematoencefálica (11, 29). Os prolongamentos destas células estão projetados por sobre os microvasos que passam pelo SNC. Esse contato íntimo indica que substâncias liberadas pelos astrócitos são capazes de modular, por exemplo, a permeabilidade do endotélio, o que de fato acontece (30). Experimentos *in vitro* evidenciaram que apenas com o co-cultivo de astrócitos e células neuro-endoteliais, o crescimento destas células mantém o aspecto encontrado na

barreira hematoencefálica, incluindo todos os marcadores encontrados *in vivo* e a presença de proteínas que compõem as *tight junctions* (31, 32).

Recentemente, a participação de astrócitos em processos patológicos tem chamado a atenção para uma nova função dessas células: a inflamatória. Astrócitos também apresentam Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR), tais como TLRs, NLR, receptores de complemento e receptores do tipo scavenger (33, 34). A participação de astrócitos em processos inflamatórios e o desfecho que o mesmo terá está intimamente relacionada com o acionamento desses receptores, uma vez astrócitos apresentam plasticidade fenotípica variada de acordo com os estímulos considerados no microambiente em questão, favorecendo, assim, o acionamento de classes diferentes de PRRs, o que garante uma variedade de possibilidades de desfecho quanto ao insulto inflamatório original e os produtos do mesmo (35).

#### 1.1.2 Astrócitos e a neuropatologia

Dada a sua capacidade de reconhecer DAMPs e PAMPs, astrócitos são capazes de participar dos processos inflamatórios no SNC. Além disso, lesões no tecido nervoso podem levar ao aumento nos níveis de glutamato no estroma do órgão. Esse aumento é capaz de induzir astrócitos a aumentar a expressão de GFAP e a multiplicação desse tipo celular, causando um evento chamado de astrogliose reativa (36, 37). A astrogliose é tida como uma cicatriz tecidual neural, caracterizada pela presença de astrócitos reativos e que participam ativamente na liberação de mediadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF $\beta$ . Outro efeito que a astrogliose induz é o remodelamento da estrutura tecidual, impedindo o crescimento de axônios na região da cicatriz, redirecionando as terminações nervosas às margens da cicatriz glial. (38, 39). A astrogliose é relatada em casos de derrame hemorrágico, por exemplo, onde há a presença de cicatriz astrocítica altamente marcada por GFAP margeando a zona da lesão, sendo perceptíveis já entre 3 a 5 dias após injúria (40).

Placas de astrogliose não são eventos exclusivos de derrames hemorrágicos, sendo encontradas também em estágios avançados da Doença de Parkinson (DP) (41, 42). Na DP, ocorre a degeneração de neurônios

dopaminérgicos da substância negra do cérebro, região com menor densidade astrocítica, se comparada com a da branca (43). Ainda que não comprovada que a falta de astrócitos possa contribuir com a progressão da DP, a ausência de resposta robusta astrogliial pode ser um dos fatores que desencadeie a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que esses neurônios não teriam mais o suporte dos astrócitos para perfeita fisiologia (44).

A aparição de placas de astrogliose em amostras *pós mortem* de pacientes e modelos animais da Doença de Alzheimer (DA) tem sido observada desde o próprio relato da Doença (45, 46). Vale ressaltar que a DA é um quadro clínico relacionado com a idade e com o aparecimento de sinais de demência, entre outros sintomas como o tremor/falta de controle de movimentos fNOS2. Análises de amostras de indivíduos senis evidenciaram uma possível relação entre o maior aparecimento de placas de astrogliose e placas senis, frequentes em quadros de demência (47). Estudos *in vitro* mostraram que a morte de neurônios e a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) poderiam ser o gatilho para a ativação dos astrócitos quanto a cicatriz glial (48).

Astrócitos são primordiais no surgimento e desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), modelo animal para Esclerose Múltipla (EM) (49, 50). A EAE reproduz os aspectos clínicos da EM, doença humana na qual o sistema imune induz uma resposta inflamatória mediada também por linfócitos T que reconhecem antígenos associados à bainha de mielina (51). Os fatores que levam ao quadro de EM ainda necessitam ser elucidados, embora a predisposição genética do indivíduo seja um fator predominante nos casos (52). Como resultado à inflamação, ocorre desmielinização do Sistema Nervoso (SN) Central (SNC) e lesões axonais, que levam a sinais clínicos heterogêneos como perda de coordenação muscular e função sensorial (52). A maioria dos pacientes apresentam eventos de surto, seguidos de remissão (surto-remissão). A doença mais grave ocorre, em geral, tardiamente, quando a soma de danos causados por eventos de surtos-remissão se acumulam e levam à fase secundária progressiva da doença (53).

Estudos demonstram a presença de astrócitos hipertrofiados associados a locais de danos axonais antes do surgimento de perda de função dos mesmos

(54, 55). Além disso, o estímulo de TNF- $\alpha$  em astrócitos faz com que eles produzam endotelina-1, que modifica a permeabilidade da barreira hematoencefálica, além de induzir a produção de fatores envolvidos na quimiotaxia e migração de leucócitos, como CXCL-2, CXCL-3, CCL2, VCAM1 e ICAM1, que estão relacionadas a via de NF- $\kappa$ B (56). Logo, os astrócitos tem participação importante no extravasamento de material oriundo do sangue no estroma do SNC. (57, 58). Além disso, citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- $\alpha$  promovem uma diminuição da expressão de transportadores de glutamato e de glutamina sintetase em astrócitos, prejudicando a capacidade dessas células em manter níveis adequados de glutamato no meio extracelular dentro do SNC(59, 60).

## 1.2 *Micróglia*

### 1.2.1 Origem e Funções

Diferente das outras células da glia, as micróglias não possuem origem de tecidos embrionários relacionados com o tecido neuroepitelial. Macrófagos embrionários detectáveis bem no início do período pré-natal são os responsáveis por migrar para a região do SN. Assim, estas células darão origem a população de micróglias a partir de divisão celular de forma independente de seus precursores hematopoiéticos (61-63). Experimentos de parabiose entre animais CD45.1 e CD45.2 evidenciam que as células mieloides encontradas posteriormente no SN mantem a sua expressão original dos seus variantes de CD45, enquanto que as amostras de alvéolos pulmonares apresentaram graus de miscigenação de marcadores celulares (64). Após a migração do saco vitelínico para a região que dará origem ao SN, estas células diferenciam-se do estado ameboide em células de vastas ramificações, dando um aspecto único as mesmas, sem impedir a sua locomoção por emissão de pseudópodes (65).

Durante o desenvolvimento do SN, micróglias participam ativamente da remodelação e orientação dos circuitos neurais a serem formados. Essa participação ocorre, por exemplo, promovendo a morte de algumas células de Purkinje (66), estimulando a formação de sinapses essenciais para o aprendizado a partir da liberação de fatores que estimulam os neurônios (67) e



até removendo células desnecessárias da cascata neurológica do hipocampo (68).

Devido a sua origem e funções, as micróglia são tidas como as células efetoras do sistema imune que são residentes do SN. Ao se deslocar pelo estroma do tecido neural, micróglia efetuam varreduras completas do SN em busca de alterações fisiológicas que possam indicar infecções e/ou lesões através da ativação de seus receptores, intimamente relacionados com a imunidade inata. Uma vez ativados esses receptores, micróglia podem sair rapidamente de um estado quiescente/de repouso para um perfil ativado, acionando processos de fagocitose e/ou secreção de mediadores inflamatórios (69). Atualmente, essa ativação de micróglia contrapõe o clássico perfil M1/M2 (pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente), uma vez que as características apresentadas por estas células são transientes e condizem muito com a região na qual a célula está, bem como o momento em que o microambiente se encontra: se de manutenção fisiológica ou de combate a situações patológicas (70).

Alguns dos receptores que micróglia apresentam são: TLR4, levando a uma robusta produção de TNF- $\alpha$ , dando às micróglia o posto de principal produtor de tal citocina no SNC (71); o receptor de glutamato  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) que, quando ativado, também desencadeia produção de TNF- $\alpha$  (72); receptores purinérgicos do tipo P2X, ativados em casos de dor crônica causada por lesão neuronal (73); receptores de TNF- $\alpha$ , funcionando como retroalimentação em processos onde já há a produção de TNF- $\alpha$  (74); receptores IL-1, como gatilho para multiplicação de micróglia (75), podendo ter efeito neuroprotetivo (76). Além desses, é interessante ressaltar que micróglia podem apresentar proteínas do MHC-II, evidenciando a sua função de apresentação de antígeno e como um link entre a imunidade inata e a adaptativa (77, 78).

### 1.2.2 Micróglia e Neuropatologia

Por ser a célula imune efetora residente e também a ponte entre a imunidade inata e adaptativa no SN, micróglia tem papel importante em processos inflamatórios locais (79). Na DP, por exemplo, vários estudos analisando amostras *post mortem* relacionaram marcadores de ativação de micróglia com o aumento frequência da doença em pacientes e em modelos animais, como aumento de MHC-II, marcadores de atividade lisossomal CD68, aumento de integrinas ICAM-I (CD54) e LFA-1 (CD11a), e células positivas para TNF- $\alpha$  e IL-6 (80-82).

Na DA, experimentos com animais deficientes para *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2), um importante receptor microglial que reconhece alterações lipídicas em seu microambiente, apontam que a ausência desse receptor em micróglia é suficiente para que placas de A $\beta$  sejam menos densas e que ocorra menor dano neural, evidenciando ainda mais o envolvimento de micróglia em processos degenerativos do SN (64). Vale ressaltar que foram encontradas características comuns de micróglia ativadas em amostras post mortem de pacientes com DA e DP (82).

Em um modelo de EAE, a presença de micróglia em placas desmielinizantes do SNC de animais no curso da doença é uma evidência da participação dessas células no desenvolvimento da patologia (83). Essa participação tem um papel duplo: as micróglia podem atuar como células efetoras pró-inflamatórias, participando de sistemas de retroalimentação que induz aumento de lesões e secretando citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como envolver-se em situações de regeneração tecidual, fagocitando *debris* de células mortas e de mielina e secretando TGF- $\beta$ , por exemplo, que tem papel regenerador neural (84, 85). Outros dados com animais transgênicos (CD11b-HSVTK) passíveis de bloquear a ação de micróglia para avaliação de seu efeito na EAE apontam que a ausência de sua participação na doença, não liberando NO e de citocinas pró-inflamatórias, indicam melhora do score clínico dos animais (86).

### 1.3 Interação astrócito-micróglia

A comunicação entre as células da glia é essencial para o desenvolvimento do SN, bem como para o ótimo desempenho de suas funções e resolução de processos patológicos locais, podendo ocorrer de forma bidirecional entre astrócitos e micróglia (87).

Por exemplo, micróglia responde rapidamente ao LPS, produzindo TNF- $\alpha$  e NO, os quais podem levar ao aumento da expressão gênica também de TNF- $\alpha$  e NO em astrócitos, mesmo que em concentrações muito inferiores quando comparadas as da própria micróglia (88, 89). Alguns experimentos reforçam essa influência, mostrando que animais WT tratados com LPS são capazes de induzir astrócitos com perfil de expressão gênica de células reativas, ao passo que animais *Csf1r*<sup>-/-</sup> (animais que não possuem micróglia) estimulados com LPS não conseguiram obter o mesmo padrão astrocítico. Outros experimentos desse mesmo trabalho apontam que as moléculas secretadas por micróglia capazes de induzir esse estado chamado de A1 em astrócitos são IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e C1q (90). Em experimentos de EAE, Rothhammer *et al.* mostraram que o VEGF-B de micróglia é capaz de induzir ativação de astrócitos, proporcionando a piora no quadro clínico dos animais, ao passo que o TGF- $\alpha$  também de micróglia é capaz de limitar a atividade patogênica dos astrócitos, freando o desenvolvimento da patologia (91).

Por outro lado, a ativação de vias de NF- $\kappa$ B de astrócitos em modelos de DA por A $\beta$  leva a liberação do fator C3 do complemento (92), agindo sobre micróglia graças ao seu receptor C3aR, prejudicando sua função fagocítica sobre A $\beta$ , piorando o *score* clínico (93). Em outro estudo, imuno-histoquímica de amostras *post-mortem* de pacientes com EM apontaram que astrócitos hipertrofiados e micróglia ficam as margens das lesões desmielinizantes. Além disso, mostram um gradiente de CCL2/MIP-1 e IL-10 em altas concentrações à margem, colocalizados com os astrócitos hipertrofiados, e baixas no centro das lesões. Essa co-localização indica que astrócitos são os responsáveis pela produção de quimioatraentes CCL2 e IP-10 e que essas quimiocinas ativam e atraem micróglia para a região da lesão (94). Em concordância, outro grupo de pesquisa demonstrou que micróglia tratadas com LPS são capazes de aumentar a expressão de IL-10 e que essa citocina é capaz de induzir astrócitos,

que expressam IL-10R1, a secretar TGF $\beta$  (95), levando a um processo de *looping* no qual o TGF $\beta$ , por sua vez, atua em micróglias diminuindo a produção de IL-1 $\beta$  e aumentando a expressão de IL-4R $\alpha$ , induzindo processo anti-inflamatório (96).

Por estes trabalhos, evidencia-se a participação e interação entre estes dois tipos celulares durante processos fisiológicos, seja em homeostase ou ainda devido a insultos inflamatórios. Entretanto, ainda há muito a se investigar para determinar a função compartimentalizada, sobretudo dos astrócitos (87, 88). Holm et al. realizaram experimentos *in vitro* com culturas enriquecidas de astrócitos rigorosamente purificadas quanto a contaminação de micróglias, mostrando que a resposta de astrócitos a estímulos de TLR2 e TLR3 são potencializadas na presença de micróglias, e ainda que a resposta de astrócitos a TLR4 só é possível na presença de micróglias (97).

Mesmo com essa dicotomia quanto a independência e autonomia da participação dos astrócitos em processos inflamatórios, é consenso na literatura que astrócitos e micróglias interagem entre si, causando regulação celular no microambiente em que ocupam, o SN. Esses trabalhos também exemplificam como relações celulares no microambiente do SN podem sofrer influência e serem reguladas de diferentes maneiras durante modelos patológicos. Em se tratando de processos inflamatórios, a interação entre o sistema imune (SI) e o SN podem ser um dos motivos pelos quais a comunicação entre astrócitos e micróglias pode ser modulada.

#### 1.4 O sistema nervoso e o sistema imune

O SNC é capaz de interagir e influenciar o Sistema Imune por pelo menos três formas bem descritas (98): (i) através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), onde o fator liberador de corticotrofina (CRF) produzido pela hipotálamo atua na hipófise, estimulando a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, induz as glândulas suprarrenais a liberarem glicocorticoides, que podem atuar diretamente em células da resposta imune (99); (ii) por meio do sistema nervoso simpático, mediada pela liberação direta de neurotransmissores, como a dopamina e a noradrenalina por fibras pós-

ganglionares que inervam órgãos linfóides primários e secundários(100), e; (iii) pelo reflexo inflamatório vagal, segundo o qual, embora não exista inervação parassimpática nos órgãos linfóides, em casos de inflamação sistêmica, o nervo vago poderia estimular nervos adrenérgicos com conseqüente liberação de noradrenalina nesses órgãos (especialmente o baço) e, através do receptor  $\beta_2$ AR de linfócitos, desencadear a produção de acetilcolina, a qual atuaria em macrófagos, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (101, 102).

#### 1.4.1 O receptor $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2$ AR)

Nos últimos anos, a participação do SNS na regulação de diferentes aspectos da resposta imune tem sido descrita. Obviamente, é necessário que as células do sistema imune, para que possam responder aos estímulos oriundos do SNS, expressem receptores adrenérgicos (98). Esses receptores são caracterizados por apresentarem sete alças que transpassam pela membrana plasmática, sendo acopladas a proteína G (GPCR), classificados então, de acordo com a propriedade da proteína G.

No caso do  $\beta_2$ AR, o acoplamento é realizado pela proteína G estimulante ( $G_{\alpha s}$ ), cuja ativação canônica leva a indução de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o qual funciona como segundo mensageiro, sobretudo para a ativação da proteína quinase A (PKA). A partir de então, PKA fosforila uma série de proteínas de vias de sinalização de efeitos variados (98, 103). Por exemplo, nosso grupo mostrou que o acionamento do receptor  $\beta_2$ AR em linfócitos T reguladores  $CD4^+$   $FoxP3^+$  aumenta seu potencial supressor, aumentando sua expressão de CTLA-4 e induzindo uma diminuição de IL-2 mRNA em células  $CD4^+$  efectoras, mecanismos os quais são mediados pelo aumento de cAMP e fosforilação de CREB dependente de PKA (104).

Sabe-se também que uma das vias de sinalização de  $\beta_2$ AR envolve a inibição de NF- $\kappa$ B (105). A interação de  $\beta$ -arrestinas 1 e 2, induzidas pelo acionamento de  $\beta_2$ AR, com o complexo  $I\kappa B\alpha$  impede sua fosforilação e conseqüente translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo. Isso impede que genes pró-inflamatórios, sobretudo de citocinas e quimiocinas, sejam transcritos (106-108).

Em um outro trabalho, nosso grupo determinou que o  $\beta_2$ AR de células dendríticas é funcional e o perfil de citocinas produzidas é alterado quando há acionamento deste receptor nas células desafiadas com LPS. Este efeito é independente da ativação de PKA e está associado à inibição da via de AP-1 e NF- $\kappa$ B. A alteração no perfil de citocinas produzidas pelas células dendríticas nesta condição impacta a diferenciação de células T efectoras (108). Nosso grupo também demonstrou que animais com hiperatividade do SNS, mediada pela deleção dos receptores responsáveis pelo *feedback* negativo na produção de noradrenalina, apresentam quadro clínico de EAE menos severo e menor grau de infiltrado inflamatório no SNC quando comparados com animais WT. Essa diminuição na severidade da doença se deve ao efeito da noradrenalina sobre os receptores  $\beta_2$ AR na montagem da resposta contra antígenos da bainha de mielina de camundongos, suprimindo a expressão de IL-2, IFN- $\gamma$  e GM-CSF, importantes citocinas para o desenvolvimento da resposta celular CD4<sup>+</sup> na EAE (109).

### 1.5 O $\beta_2$ AR e a interação astrócitos-micróglia

Sabe-se que astrócitos expressam  $\beta_2$ AR e que os mesmos desempenham importantes funções, incluindo na modulação o metabolismo do glutamato e da glicose (110). Além disso, a ausência dele parece comprometer o controle de proliferação e aumenta a expressão de GFAP nessas células, todos esses eventos relacionados com astrogliose. Também, estudos já verificaram a redução na expressão do  $\beta_2$ AR em pacientes com EM (49, 103, 111, 112).

Em se tratando das micróglia, estimular cultura de micróglia com os agonistas de  $\beta_2$ AR adrenalina, isoproterenol e forskolina suprimem a multiplicação desse tipo celular (113). Além disso, o acionamento do receptor  $\beta_2$ AR por baixas doses do composto farmacêutico salmeterol tem efeito protetivo sobre o SNC, uma vez que, frente ao estímulo com LPS, reduz a expressão de TNF- $\alpha$ , NO produzido por micróglia, os quais tem efeito deletério sobre neurônios e outras células do SN (114).

Pelo exposto, sabe-se que o acionamento do receptor  $\beta_2$ AR tem efeito em processos fisiológicos e de resposta inflamatória de astrócitos e micróglia independentemente. Entretanto, ainda é necessário estabelecer a relação entre esse acionamento do receptor  $\beta_2$ AR e o efeito a ser observado quando essas células atuam em conjunto, sobretudo pormenorizando os efeitos da resposta inflamatória desencadeada em astrócitos. O entendimento de como esse receptor atua nessas situações servirá como mais uma evidência para o uso desse receptor como alvo terapêutico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos do acionamento do receptor  $\beta_2$ -adrenergico ( $\beta_2$ AR) na interação astrócito-micróglia em modelo inflamatório *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a produção de citocinas de cultura celular mista de astrócitos e micróglia primários frente ao estímulo de LPS;
- Determinar se o acionamento do  $\beta_2$ AR em cultura mista de astrócitos e micróglia interfere na produção de quimiocinas e citocinas após o estímulo dessas células com LPS;
- Estudar vias de sinalização envolvidas em eventuais fenômenos observados quando há o acionamento do receptor  $\beta_2$ AR na cultura mista;
- Determinar a produção de citocinas de cultura enriquecida de astrócitos, livre de micróglia, estimulada com LPS;
- Determinar se as citocinas produzidas em culturas enriquecidas de micróglia estimuladas com LPS é capaz de induzir expressão de citocinas e quimiocinas em culturas enriquecidas de astrócitos;
- Determinar se o acionamento do receptor  $\beta_2$ AR é capaz interferir na produção de citocinas pela cultura enriquecida de micróglia e seu impacto na relação astrócitos-micróglia;
- Determinar se o TNF- $\alpha$  oriundo de micróglia é um bom indutor de produção de citocinas em cultura enriquecida de astrócitos;
- Estudar vias de sinalização envolvidas no acionamento do receptor  $\beta_2$ AR em astrócitos;



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as determinações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Lei nº 11.794, de 08/10/2008, Resolução normativa nº 1 – CONCEA, como aprovado sob o protocolo 06/2017. Todos os procedimentos também estão de acordo com as normas do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, aprovado em 19/05/2017 sob o nº 2872270317.

#### 3.2 Cultura enriquecida de astrócitos

Astrócitos primários foram obtidos de cultura mista de células corticais (115). Encéfalos de animais C57BL-6 neonatos foram coletados e separados do bulbo olfatório e do cerebelo. O tecido cortical foi mecanicamente dissociado e submetido a digestão enzimática em solução de Tripsina 5% (Instituto Adolfo Lutz, Núcleo de Cultura de Células, São Paulo, Brasil) por 30 minutos em banho-maria (Sieger Equipamentos Médicos Laboratoriais, PR, Brasil) a 37°C, sendo agitado a cada 10 minutos. A solução foi posteriormente centrifugada (HERMLE Labortechnik GmbH, Alemanha) a 300 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante para obtenção da massa celular. As células foram ressuspendidas em 10 ml de meio DMEM (Life Technologies Corp., NY, Estados Unidos) suplementado com 10% de SFB (Life Technologies do Brasil, Brasil), 5 µg/ml de piruvato (Life Technologies Corp., China), 2 mmol/L de glutamina (Life Technologies Corp., NY, Estados Unidos), 50 u/ml de penicilina e de estreptomicina, HEPES (Life Technologies Corp., NY, Estados Unidos). O conteúdo foi homogeneizado até a obtenção de uma solução de células individualizadas em suspensão. A solução foi passada para garrafa de 75 cm<sup>2</sup> (SARSTEDT AG & Co., Alemanha) de área e completos com o meio DMEM suplementado até o volume final de 20 ml. A primeira troca de meio é feita 48 horas após a obtenção do mix cortical, sendo refeito após 72 horas em diante, até atingir a confluência. Para a obtenção de células suficientes para uma garrafa T75 cm<sup>2</sup> de área, são usados 4 animais entre 0 e 3 dias de vida.

Para o repique e separação de outros tipos celulares, as garrafas de cultura são submetidas a agitação orbital (Novatecnica, SP, Brasil) a 37°C por 6 horas. O sobrenadante contendo micróglia é descartado. O repique segue com a lavagem da cultura com PBS e digestão enzimática por tripsina, inativação com meio DMEN suplementado, centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão em meio completo para recolocar em outras duas garrafas de 75 cm<sup>2</sup> de área. Este procedimento foi repetido semanalmente quando a cultura celular atingia confluência em monocamada até o 20º dia após a extração.

Entre 21º e 28º dia após a extração, os astrócitos atingiam sua maturação (115), estando aptas para os experimentos *ex-vivo*. A cultura celular passou pelo mesmo processo de repique para serem mantidas em cultura em placa de 6 poços (SARSTEDT AG & Co., Alemanha) até atingirem confluência celular em monocamada. Cada poço de placa de 6 poços rendem um total de 5x10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células.

### 3.3 *Ensaio ex-vivo*.

#### 3.3.1 Pureza da cultura celular

Para verificar a pureza da cultura celular de astrócitos primárias oriundas do mix cortical, as células foram submetidas a aquisição de imagens de Reação de Imunofluorescência (RIFI) e a citometria de fluxo.

#### 3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI

Para a obtenção das lâminas dos astrócitos primários, as células foram recolocadas a partir do 21º dia em placa de 6 poços contendo em seu fundo, 4 lamínulas por poço. Quando atingiram a confluência celular, as lamínulas contendo as células foram lavadas 3 vezes em PBS (Sigma-Aldrich, CA, Estados Unidos) e alocadas em poços individuais de placa de 24 poços (SARSTEDT AG & Co., Alemanha). As células foram fixadas com PFA (Comercial Bono Ltda., SP, Brasil) 4% por 1 hora à temperatura ambiente. Para a marcação, foram utilizados os anticorpos 1<sup>os</sup> para as estruturas de GFAP ( $\alpha$ -GFAP primário (anti-mouse [G-A-5], 1:1000, Cy3®) (Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido) em solução permeabilizante de PGN-saponina por 1 hora em câmara úmida e ao abrigo da

luz. A marcação do núcleo foi realizada com DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos), também por 1 hora em câmara escura e úmida. As lâminas foram montadas com meio anti-decaimento PGN em glicerol e esmaltadas. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência Olympus BX51, câmera Olympus DP71.

### 3.3.3 Citometria de Fluxo

Para a realização da citometria de fluxo da cultura mista cortical primária, as células foram recolocadas a partir do 21º dia em placa de 6 poços até atingirem a confluência celular. As células foram, então, lavadas com PBS, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante, descartado. Foi utilizado uma solução com bloqueadores de receptores Fc com  $\alpha$ -CD16-32 – 2  $\mu$ l/100 $\mu$ l de MACs buffer (Ebioscience, CA, Estados Unidos) por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS antes de passarem por marcação superficial com Mix de anticorpo para CD45 (*anti-mouse CD45 (Ly-5)*, 1:100, PE) e CD11b (*anti-mouse CD11b*, 1:100, eFluor® 450) em PBS, por 20 minutos ao abrigo da luz. As células são então lavadas para a fixação e permeabilização celular, feita com o kit FIX/PERM BUFFER. (Ebioscience, CA, Estados Unidos). A marcação intracelular de GFAP (*anti-mouse CD11b*, 1:100, eFluor® 660) foi feita de acordo com o protocolo do fabricante do kit de permeabilização, por 20 a 30 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em MACs buffer. A leitura de citometria foi realizada no citômetro FACs Canto II (BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos), e as análises, com o uso do software FlowJow® (Stanford University, CA, Estados Unidos).

A realização da separação das células de cultura mista cortical para uso em experimento com culturas de micróglia purificadas e astrócitos purificados seguiu o mesmo protocolo, excluindo os passos de fixação com o kit FIX/PERM BUFFER e marcação intracelular de GFAP. A leitura dessa citometria se deu em citômetro de fluxo FACSAria II (BD Bioscience, San Diego, CA, Estados Unidos). As células eram coletadas em tubos em concentração final de 20 % SFB. As células eram lavadas após a obtenção de populações distintas: CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (consideradas como micróglia) e CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> (astrócitos). Micróglia eram

mantidas em meio RPMI a 20% SFB até o dia do experimento. Astrócitos eram mantidos em DMEM a 20 %SFB até alcançarem confluência para a realização do experimento.

#### 3.3.4 Produção de citocinas

Para quantificar a produção de citocinas por cultura mista cortical, as células foram ativadas com LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 6, 12 ou 24 horas. Para avaliar os efeitos do receptor  $\beta_2\text{AR}$  na produção de citocinas induzida pelo LPS, as células foram previamente tratadas com agonista específico (fenoterol Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, Estados Unidos, 1  $\mu\text{M}$ , 15 minutos) ou Noradrenalina (1  $\mu\text{M}$ , 15 minutos Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, Estados Unidos).

Em se tratando dos experimentos que usaram MCM (meio condicionado de micróglia), micróglia foram estimulados em DMEM com LPS na concentração de (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas, após terem sido previamente tratadas ou não com fenoterol (1  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos. O meio era então coletado para a utilização em astrócitos por 24 horas, tendo estes últimos também passado ou não pelo tratamento prévio de fenoterol (1  $\mu\text{M}$ , 15 minutos).

O sobrenadante das culturas foi então coletado nos respectivos pontos para a dosagem de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2) por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos).

#### 3.3.5 Análise de ativação de via de sinalização

Para avaliar a via de sinalização envolvida no acionamento dos  $\beta_2\text{AR}$ , as células passaram por tratamento com o inibidor da proteína quinase A (PKA), H89 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, Estados Unidos) a 20 ou 40  $\mu\text{M}$ , por 30 minutos antes do tratamento com noradrenalina descrito acima. O sobrenadante foi coletado 24 horas após o desafio com LPS a 1  $\mu\text{g/ml}$  para a dosagem de citocinas por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc., Viena, Áustria).

Ainda para avaliar vias de sinalização envolvidas no acionamento do  $\beta_2\text{AR}$ , utilizamos a técnica de *Western Blot* para detectar a presença de CREB

fosforilado e de NF- $\kappa$ B, analisado em extrato proteico total (para CREB fosforilado) e em extratos proteicos de citoplasma e nuclear (para NF- $\kappa$ B e CREB fosforilado). Células foram tratadas ou não com o inibidor de  $\beta_2$ AR (ICI 118.551), inibidor de PKA (H89), Fenoterol ou Noradrenalina, tal como já descrito e indicado nas figuras. Para experimentos envolvendo LPS, foi feito o estímulo das culturas na concentração de 1  $\mu$ g/ml por 1, 2 e 3 horas. Após a lavagem da cultura celular em PBS, foi obtido o extrato proteico. O extrato proteico total foi obtido com o uso de tampão de lise, contendo inibidor de proteases. Para a obtenção de extratos dos compartimentos celulares de citoplasma e núcleo, foi feita a separação dos compartimentos celulares usando o “Cell Fractionation Kit” (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Estados Unidos). A dosagem proteica de cada um dos extratos celulares foi feita com o Kit “Micro BCA Protein Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, Estados Unidos). A dosagem proteica de cada um dos extratos celulares foi feita com o Kit “Micro BCA Protein Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, Estados Unidos). A quantidade proteica utilizada para cada dosagem foi de 20  $\mu$ g em gel 12% de acrilamida, utilizando o kit “TGX FasCast Acrylamide Kit, 12%” bem como os tampões do mesmo fabricante (Bio-Rad, Estados Unidos). A transferência do gel foi feita para membrana de polivinil difluorido (PVDF) (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, CO, Irlanda). O bloqueio dos sítios ausentes de proteína na membrana foi feito com solução de Tris-buffer salina (TBS) (Bio-rad) com de 1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) contendo 5% de Blocker (Bio-Rad) por 1 hora. A marcação dos anticorpos primários para NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B p65 (C22B4) rabbit mAb, 1:1000, Cell Signaling Technology), CREB fosforilado (P-CREB (S133) rabbit mAb, 1:1000, Cell Signaling Technology), GAPDH (GAPDH (14C10) rabbit mAb, 1:1000) e H3 total (Histone H3 (D1H2) rabbit mAb, 1:700) foi feita *overnight* a 4°C sob agitação leve em diluição 1:1000 em TBS-T contendo 5% de BSA (Sigma Aldrich). A marcação com anticorpo secundário (anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody, 1:3000, Cell Signaling Technology) foi feita em 1 hora a temperatura ambiente sob agitação leve em solução de TBS-T contendo 5% de MILK (Bio-Rad). Para obtenção do sinal foi utilizado o quimiorrevelador (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) e as imagens foram adquiridas em fotodocumentador Alliance 4,7 (UVITEC, Cambridge, Reino Unido). Cada proteína

foi marcada individualmente e feito a aquisição da imagem. Entre cada marcação primária, foi feita a lavagem da membrana com solução “Re-Blot Plus Mild Solution” (Merck Millipore) por 15 minutos sob agitação moderada a temperatura ambiente. Entre cada marcação, foram feitas séries de três lavagens da membrana com TBS-T, cada uma durando 5 minutos sob agitação moderada e a temperatura ambiente.

### 3.4 Estatística

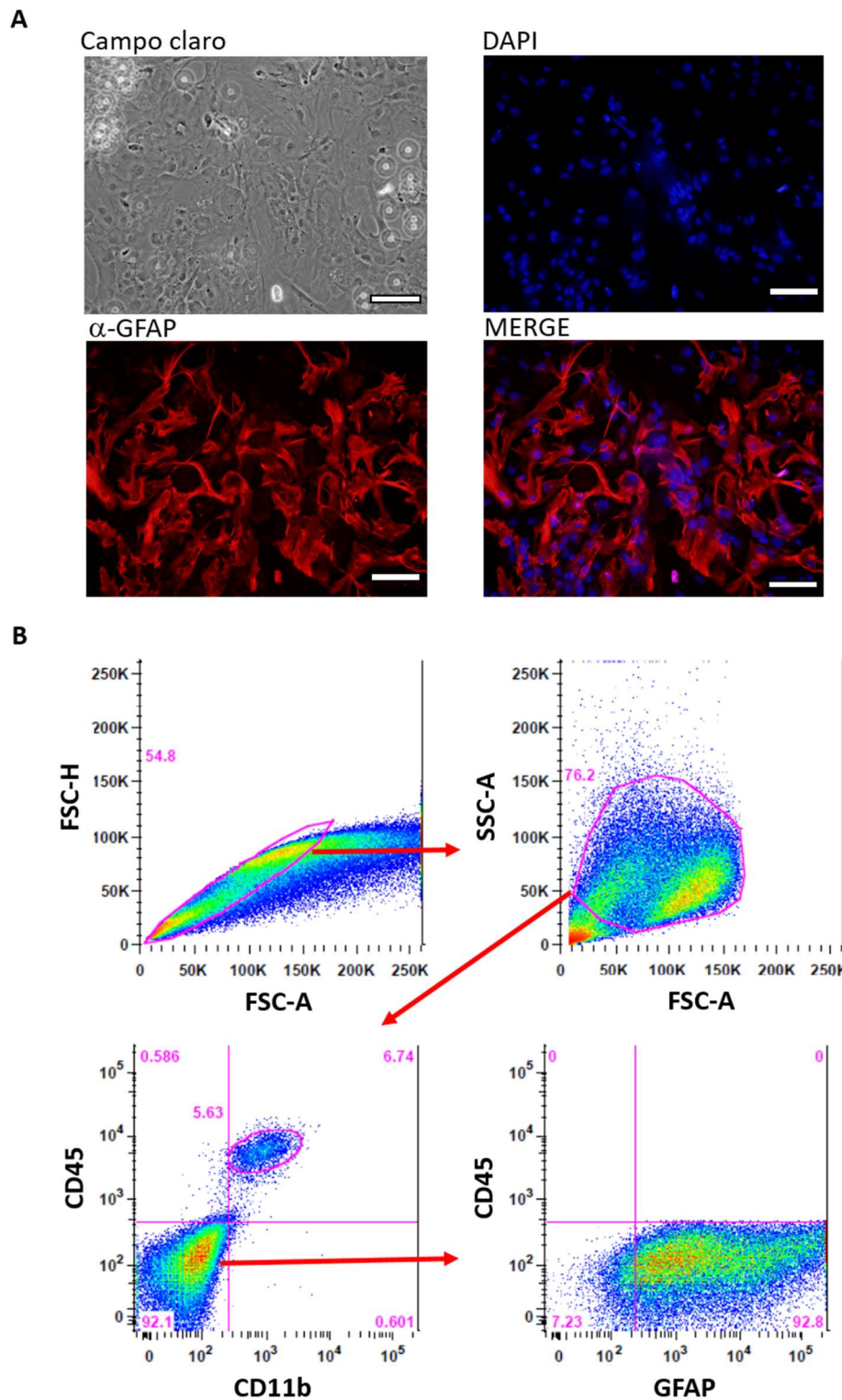
O número de cópias experimentais realizadas está indicado em cada ensaio. A significância dos mesmos foi determinada com o auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, Estados Unidos) versão 6.01, sendo utilizado o método One-way ANOVA e Tukey como *pos test*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (5%).

## 4 RESULTADOS

Astrócitos estão envolvidos em diversos e importantes processos fisiológicos no SNC (116). Na tentativa de entender seu envolvimento na inflamação, utilizamos da técnica de cultura primária enriquecida de astrócitos derivada de mix de células corticais de animais C57BL-6 neonatos. Estes astrócitos atingem sua maturidade funcional entre o 21º e 28º dia de cultura (115). Para verificar o fenótipo da cultura obtida, utilizamos RIFI e Citometria de Fluxo (Fig. 1).

A cultura de células obtida apresentou uma monocamada de células grandes e com expressão do marcador de astrócitos GFAP em intensidade variada (Fig. 1A). Corroborando com esse dado, na citometria, apenas uma parcela muito baixa de células CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> não expressam GFAP, enquanto que a grande maioria dessa população apresenta expressão baixa do marcador, enquanto poucas expressam muito. A citometria evidenciou ainda que a cultura celular obtida é composta por aproximadamente 90-95% de células CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>, sendo o restante (~5-10%) de células CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>. A critério de classificação neste texto, consideraremos a partir daqui, que as células CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> desta cultura são micróglias, e que as células CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>, astrócitos.

**Figura 2** – Cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais



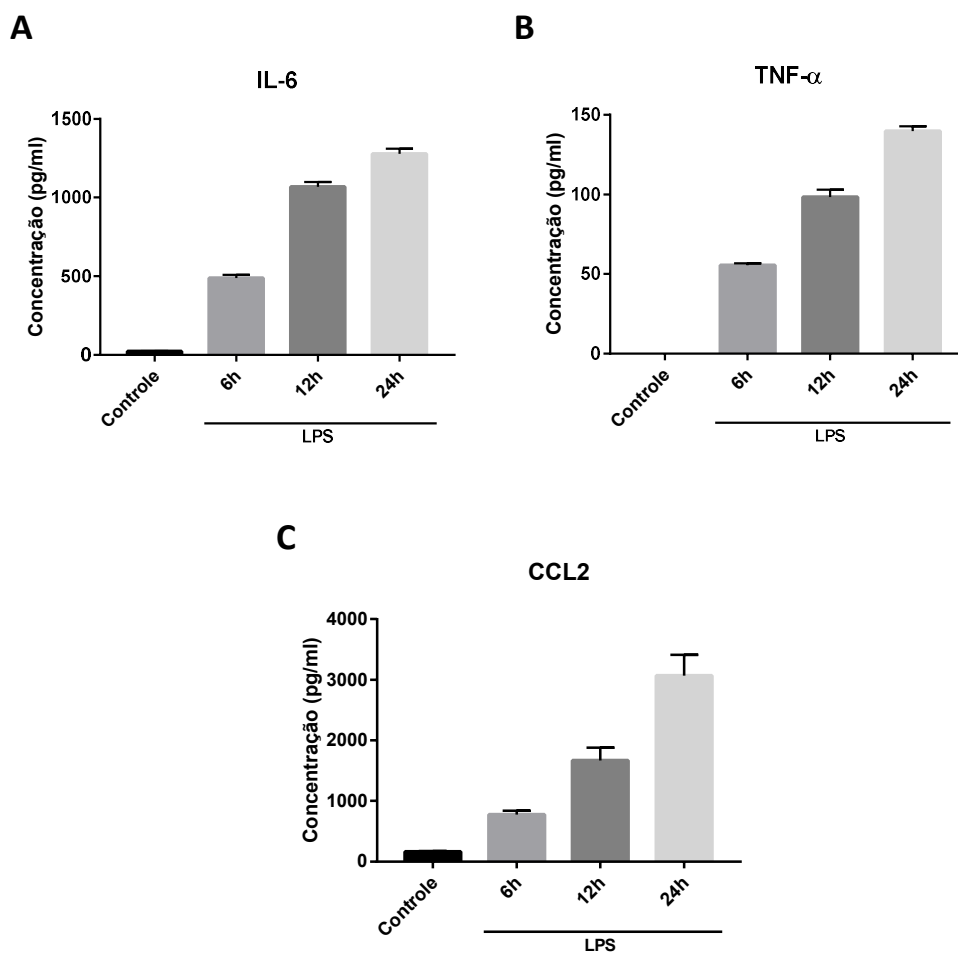
Células foram mantidas em cultura em meio DMEM suplementado. Análises foram feitas entre 21°-28° dias. A. Aumento de 200x de campo claro e suas respectivas marcações para  $\alpha$ -GFAP e DAPI. A barra indica escala representativa de 100  $\mu$ m. B. Citometria de fluxo das células marcadas com  $\alpha$ -CD45,  $\alpha$ -CD11b e  $\alpha$ -GFAP.



Para verificar a funcionalidade da cultura enriquecida de astrócitos em possíveis processos inflamatórios, foi realizado uma cinética quanto a produção de citocinas típicas desse tipo celular quando desafiado com LPS (Fig. 2).

Células de mix de córtex de camundongos neonatos apresentam produção das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2 nos pontos de coleta de sobrenadante de 6, 12 e 24 horas. Essa produção aumenta de forma tempo-dependente (Fig. 2).

**Figura 2** – Curva de produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente ao desafio de LPS.



Culturas enriquecidas de astrócitos, derivada de mix de células corticais, foram tratadas com LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). O sobrenadante foi coletado nos tempos de 6, 12 ou 24 horas para dosagem de citocinas (ELISA). A, B e C. Dosagem de IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2, respectivamente. Dados representativos de um experimento realizado (n=3).

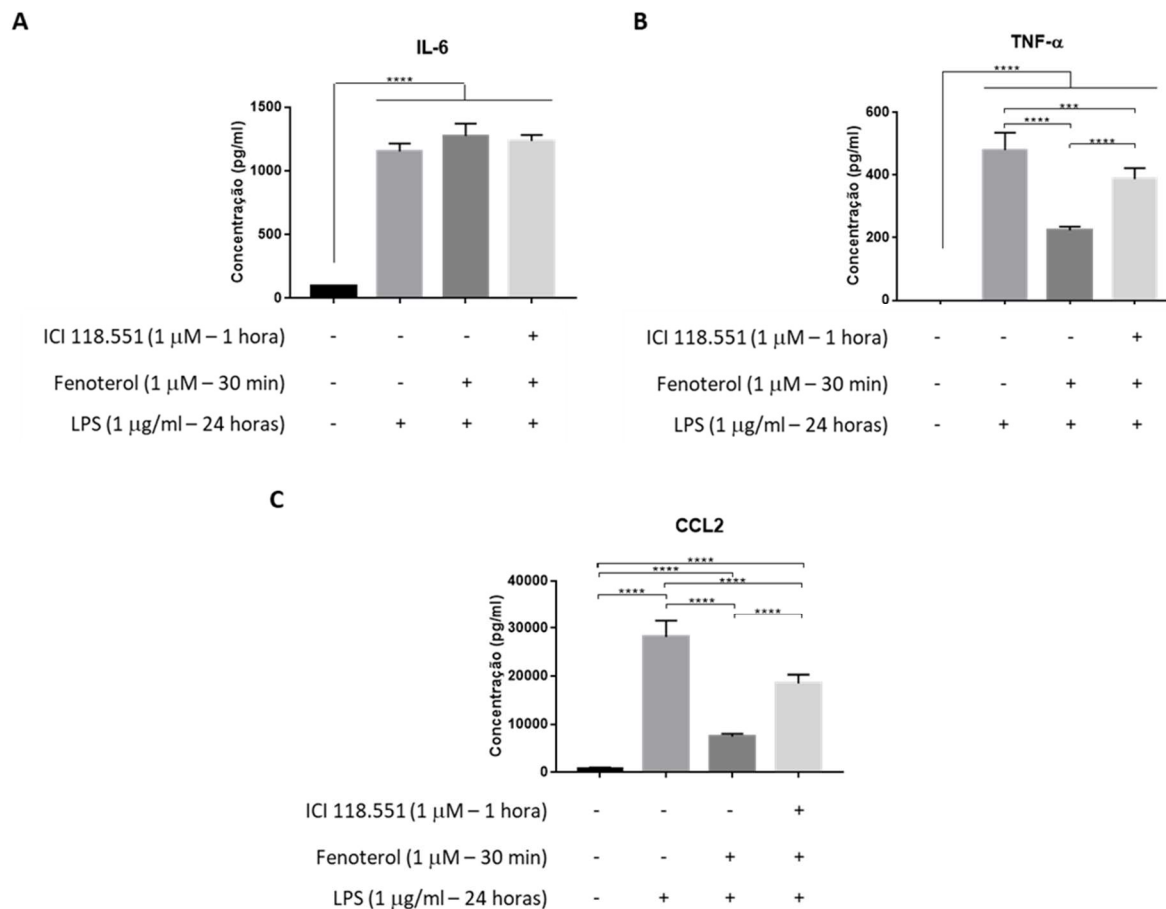
A expressão de citocinas observada no tempo de 24 horas é a mais abundante (Fig. 2). Dessa forma, julgamos que seria o melhor tempo para verificar se haveria modulação desta produção de citocinas quando estas células fossem previamente tratadas com ligantes do  $\beta_2$ AR.

Sabe-se do efeito de neurotransmissores e, em particular, da noradrenalina ativando o  $\beta_2$ AR em células do sistema imune (98, 108).

Foi feito, então, o tratamento das células com o agonista (Fenoterol) e o antagonista (ICI 118.551) do  $\beta_2$ AR, previamente ao desafio com LPS (Fig. 3). Esse procedimento foi realizado para verificar se a ativação dos  $\beta_2$ AR nas células presentes na cultura é capaz de modular o perfil de expressão de citocinas frente ao estímulo inflamatório.

O tratamento com Fenoterol não foi capaz de modular a expressão de IL-6 (Fig. 3A). Entretanto, a administração de Fenoterol à cultura celular antes do desafio com LPS foi capaz de diminuir a produção de TNF- $\alpha$  e CCL2. Concomitantemente, quando as células eram submetidas a incubação com ICI 118.551 antes do tratamento com Fenoterol, o efeito redutor da expressão de citocinas foi revertido parcialmente (Fig. 3B e 3C).

**Figura 3** – Produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente a ativação de  $\beta_2$ AR com fenoterol e desafio de LPS.

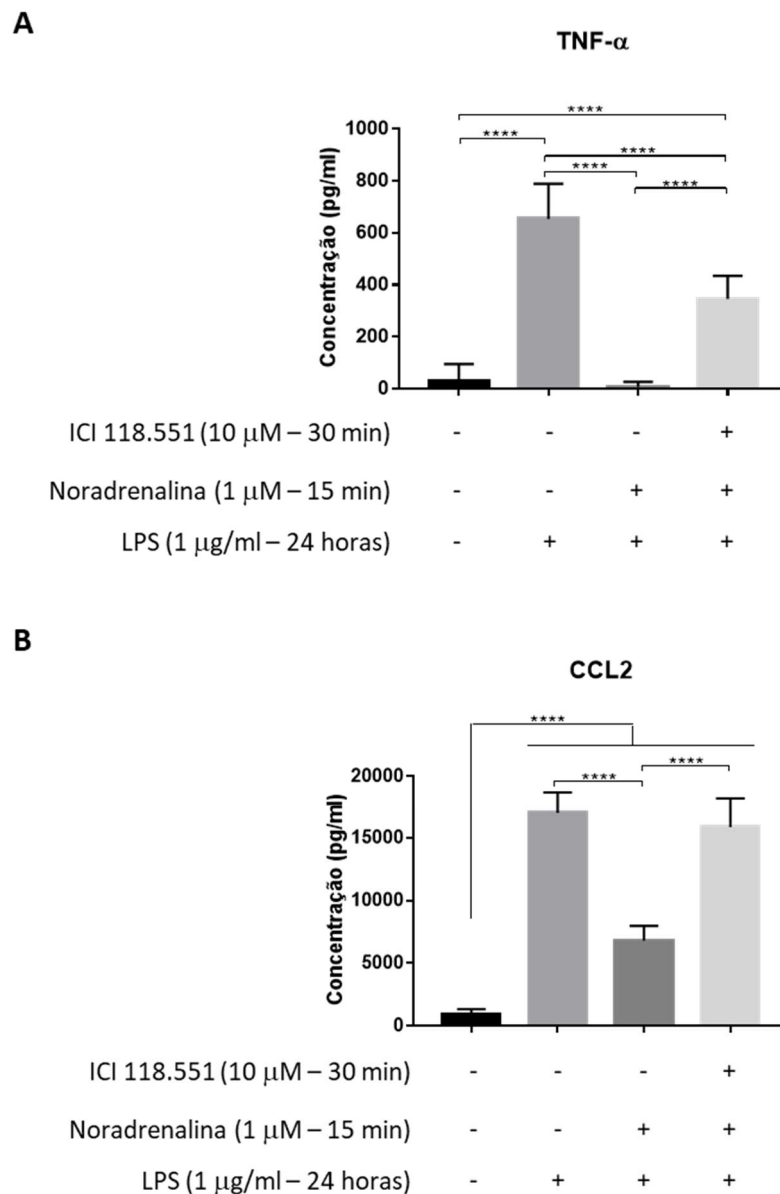


Cultura enriquecida de astrócitos foi tratada com Antagonista de  $\beta_2$ AR (ICI118.551; 1 hora; 1  $\mu$ M), Agonista de  $\beta_2$ AR (Fenoterol; 30 min; 1  $\mu$ M) e/ou LPS (24 horas; 1  $\mu$ g/ml). O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A, B e C. Dosagem de IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2, respectivamente. Dados representativos de dois experimentos realizados (n=3). \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001.

Uma vez que não houve modulação na produção de IL-6 pelas células em resposta ao tratamento com Fenoterol e LPS, a investigação desta citocina, bem como sua dosagem, foi deixada em segundo plano.

Mesmo que o Fenoterol possuísse efeito biológico, ainda se fazia necessário o teste com o agonista fisiológico dos  $\beta_2$ AR: a Noradrenalina. Assim, o mesmo experimento foi realizado para verificar se a Noradrenalina reproduzia os efeitos na redução da produção de citocinas pelas células.

**Figura 4** – Produção de citocinas por cultura enriquecida de astrócitos, derivada de mix de células corticais, frente a ativação de  $\beta_2$ AR por Noradrenalina e desafio de LPS.



Cultura enriquecida de astrócitos foi tratada com Antagonista de  $\beta_2$ AR (ICI118.551; 30 min; 10  $\mu$ M), Noradrenalina (30 min; 1  $\mu$ M) e/ou LPS (24 horas; 1  $\mu$ g/ml). O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas (ELISA). A e B. Dosagem de TNF- $\alpha$  e CCL2, respectivamente. Dados representativos de dois experimentos realizados (n=3). \*\*\*\*p<0,0001.

Assim como usando o Fenoterol (Fig. 3B e 3C), o tratamento das células com Noradrenalina foi capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  e CCL2 pelas mesmas quando desafiadas com LPS. Ainda, o tratamento com ICI 118.551 também foi capaz de reverter parcialmente o efeito da Noradrenalina (Fig. 4).

## 5 DISCUSSÃO

No nosso modelo, o estímulo de micróglia em contato direto ou indireto com astrócitos propicia a ativação destes últimos, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, de sabidas ações autócrinas e parácrinas. A atividade inflamatória de células não relacionadas diretamente com a origem do Sistema Imunológico tem sido evidenciada cada vez mais. Assim, astrócitos desempenham importantes e essenciais funções no sistema nervoso, também relacionados a inflamação.

Uma vez envolvidos em situações inflamatórias diversas, como o Mal de Alzheimer, derrames, Parkinson e Esclerose Múltipla, astrócitos são sensíveis as alterações do microambiente em questão, produzindo uma série de citocinas e alterando seu metabolismo. De fato, a participação de astrócitos nesses processos não o colocam em papel de destaque ou protagonismo direto, de forma que sejam os causadores dessas doenças. Entretanto, é importante ressaltar que essas alterações metabólicas fazem com que suas funções de dar suporte ao restante do sistema nervoso sejam comprometidas. Por exemplo, doenças do sistema nervoso central podem estar relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático, uma vez que o proteoma das células do microambiente em questão possam estar em desbalanço, já que passam a produzir e secretar citocinas de forma demasiada em resposta à inflamação local, o que pode levar a ativação da via UPR (do inglês, *Unfolded Protein Response*) (117). Em relação aos astrócitos, a ativação da UPR, mais especificamente a relacionada a PERK (do inglês, *protein kinase R-like endoplasmic reticulum (ER) kinase*), leva a condições neurodegenerativas *in vivo* e *in vitro*, uma vez que o proteoma de astrócitos é prejudicado e deixa de secretar proteínas importantes para a manutenção de sinapses e do desenvolvimento neuronal. Além disso, a utilização de modelos animais infectados com Prion onde a via de PERK é bloqueada apenas em astrócitos evidencia seu potencial protetivo, uma vez que previne a perda neural e prolonga significativamente a vida desses animais (118).

Nossos dados mostram que a presença de mediadores inflamatórios, sobretudo de TNF- $\alpha$ , no sobrenadante condicionado de micróglia incitadas com LPS é capaz de estimular astrócitos a aumentarem seus níveis de mRNA de moléculas pró-inflamatórias como *Tnf-a*, *NOS2* e *Ccl2*. Em concordância com nossos dados, Oliveira et.al demonstraram que a infecção de astrócitos com vírus SARS-CoV2 culmina com a expressão de *Tnf-a*, *Il-1b*, *Il-6* e *Ifn-a*. Além disso, a presença do vírus causa alterações fisiológicas nos astrócitos, aumentando o gasto de energia e consumindo mais moléculas energéticas, como a glutamina, além de aumentar a taxa de multiplicação celular, corroborando com os nossos dados de efeitos na transcrição genética e com os presentes na literatura (119).

Aqui, não abordarei a possibilidade de que essa multiplicação celular induzida possa ser um mecanismo o qual faz com o que o próprio vírus se mantenha no sistema. Por outro lado, destaco a via de glutamato relacionado a astrócitos, já que, assim como supracitado, astrócitos são mantenedores de níveis de glutamato extracelular e fornecedores de glutamina para neurônios, sendo essencial para a homeostase do sistema nervoso. Sob essa óptica, ressalto que os astrócitos são sensíveis ao processo inflamatório causada pela infecção viral de células vizinhas ainda antes mesmo da consolidação de infecção do próprio astrócito e de todo o processo de infecção e alteração de metabolismo caracterizado por este modelo do trabalho de Oliveira et.al (119).

Em suma, a sensibilização dos astrócitos nesse ambiente inflamatório pode se dar diretamente (ex., presença do vírus) e, principalmente, indiretamente pela ativação de receptores dessas células sensíveis a citocinas pró-inflamatórias. A origem dessas citocinas pode ser de células regionais, como micróglia ou até mesmo de outros astrócitos, as quais foram primeiramente ativadas graças a dano tecidual e/ou a presença de patógenos (PAMPs e DAMPs). Seja qual for a origem, fato é que a ativação leva a produção de mais citocinas e a potencialização de processos inflamatórios. No nosso modelo, a ativação de astrócitos pelo meio condicionado evidenciou sua importante função em processos que envolvam o recrutamento celular de fagócitos, uma vez que culminou na grande produção de CCL2, conhecida quimiocina relacionada a migração de monócitos, macrófagos, micróglia, entre outras células.

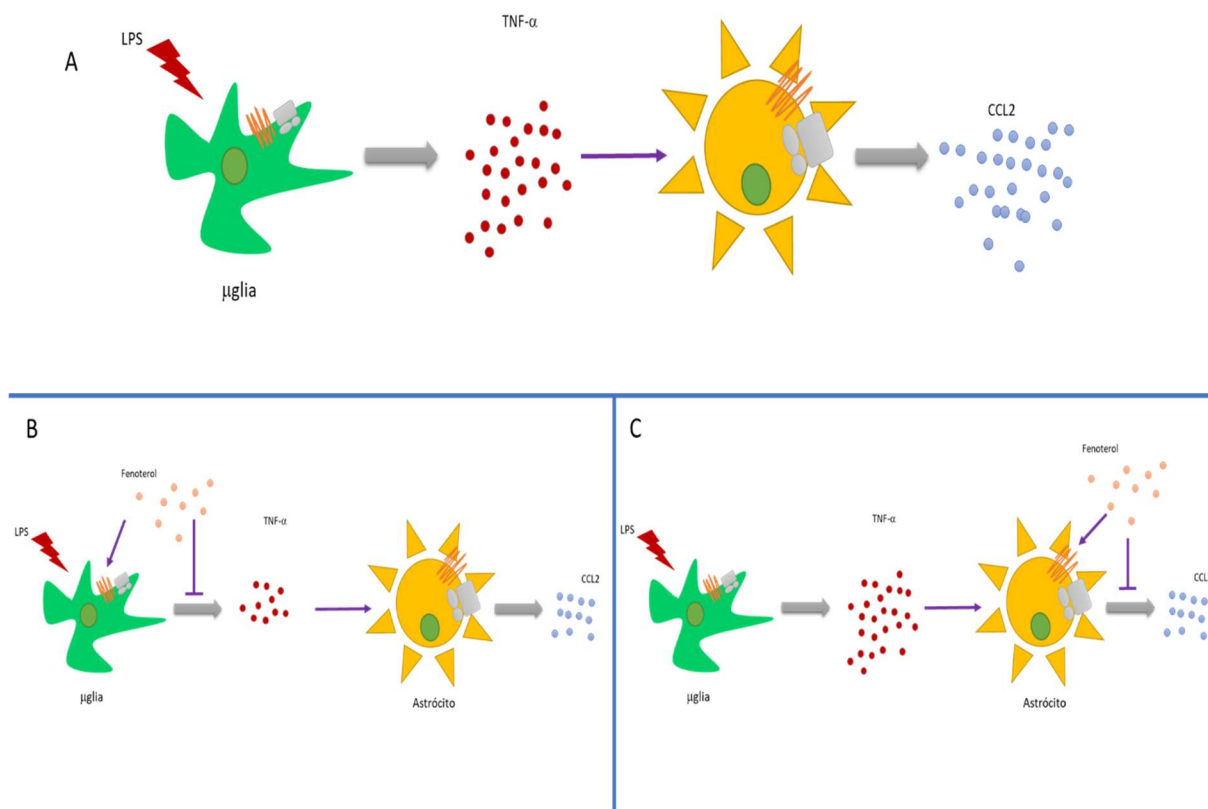
Ainda relacionado ao trabalho de Oliveira et.al, 2021, a infecção por SARS-CoV2 em astrócitos leva a alteração metabólica significativa relacionada a via do glutamato no sistema nervoso. Aqui, embora a alteração metabólica astrocítica não seja o protagonista dos danos causados pela própria infecção viral no sistema nervoso, fica ainda mais evidente de que a participação de astrócitos em processos de homeostase é prejudicada fortemente, potencializando os danos causados pela infecção viral. De forma semelhante, nossos dados mostram que o estímulo de LPS em si sobre astrócitos não tem efeito direto, uma vez que o LPS por si só não foi capaz de estimular astrócitos. Mas, que a presença deste insulto no meio é capaz de provocar uma reação em série, levando a ativação e alterações em astrócitos, oriundas de células parácrinas.

Assim como consta na literatura (87), durante nossa revisão bibliográfica, encontramos trabalhos que utilizam modelos semelhantes aos nossos, com o uso de culturas ditas purificadas de astrócitos e que atribuíam o efeito biológico observado tão somente a eles, seja por desprezar a quantidade “ínfima” de micróglias encontradas após a purificação (1-10%), ou até mesmo por não mencionar a possibilidade de que essas culturas de astrócitos poderiam ter outros tipos células, descartando, em todos os casos, a participação de outras células no fenômeno observado.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados apontam que micróglia ativadas com LPS *in vitro* são capazes de produzir e secretar citocinas, sobretudo TNF- $\alpha$ , o qual irá estimular astrócitos a produzirem citocinas pró-inflamatórias, principalmente CCL2. Além disso, o uso de agonistas do  $\beta_2$ AR foi capaz de diminuir tanto a produção de citocinas por parte de micróglia quanto por parte dos astrócitos.

**Figura 18** – Esquema de interação micróglia-astrócito durante indução inflamatória *in vitro* por LPS e modulação por acionamento do  $\beta_2$ AR.



Esquema representa a interação micróglia-astrócito durante modelo *in vitro* de inflamação por LPS. A. Microglias são sensíveis a LPS, produzindo citocinas, tal como TNF- $\alpha$ , que, por sua vez, estimula astrócitos a produzirem mais citocinas, tal como CCL2. B. Quando há o acionamento do  $\beta_2$ AR, em micróglia, há uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$ , que estimula fracamente astrócitos, induzindo menor produção de CCL2 pelos astrócitos. C. O acionamento do  $\beta_2$ AR somente em astrócitos também é capaz de reduzir a produção de CCL2, mesmo com o mesmo estímulo de TNF- $\alpha$  oriundo de micróglia.

Baseado no que a literatura norteia, este trabalho reforça que a interação entre astrócitos e micróglia é essencial para o bom funcionamento de qualquer resposta no sistema nervoso central, seja ela homeostática ou dinâmica, inflamatória ou não.



Além disso, nosso trabalho sugere dois importantes alvos terapêuticos: a regulação da produção de TNF- $\alpha$  em micróglias, capaz de estimular astrócitos (e outras células de forma sistêmica ou parácrina), e; o envolvimento de agonistas de  $\beta_2$ AR em ambas as células, diminuindo possíveis efeitos deletérios que os processos inflamatórios exacerbados possam ter. Diante de uma variedade de doenças no sistema nervoso central, que por vezes se apoiam em processos com *checkpoints* de sinalização celular em comum, nossos dados contribuem com o respaldo de que o uso terapêutico suplementar de agonistas de  $\beta_2$ AR, sobretudo em relações astrócito-microglia, possam ser explorados de forma a melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofram desses males.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Jha MK, Kim JH, Song GJ, Lee WH, Lee IK, Lee HW, et al. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. *Prog Neurobiol.* 2018;162:37-69.
2. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells.* 2019;8(11).
3. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):661-5.
4. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
5. Sauvageot CM, Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(3):244-9.
6. He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):616-25.
7. Sun YE, Martinowich K, Ge W. Making and repairing the mammalian brain--signaling toward neurogenesis and gliogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14(3):161-8.
8. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 1971;28(2):351-4.
9. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(6):665-73.
10. Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1):22-35.
11. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53.
12. Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 2008;86(4):342-67.
13. Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):194-206.
14. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science.* 2001;291(5504):657-61.
15. Goritz C, Mauch DH, Nagler K, Pfrieger FW. Role of glia-derived cholesterol in synaptogenesis: new revelations in the synapse-glia affair. *J Physiol Paris.* 2002;96(3-4):257-63.
16. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci.* 1998;1(8):683-92.
17. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):523-30.
18. Verkhratsky A, Steinhauser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32(2-3):380-412.
19. Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience.* 2004;129(4):999-1010.
20. Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia.* 1999;26(1):73-83.
21. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008;60(3):430-40.

---

<sup>1</sup> De acordo com International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: [https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

22. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 2005;120(3):421-33.
23. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-78.
24. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 2000;32(1):1-14.
25. Curtis DR, Johnston GA. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiol*. 1974;69(0):97-188.
26. Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int*. 2002;41(2-3):123-42.
27. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*. 1979;161(2):303-10.
28. Waagepetersen HS, Qu H, Sonnewald U, Shimamoto K, Schousboe A. Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons. *Neurochem Int*. 2005;47(1-2):92-102.
29. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*. 2002;200(6):629-38.
30. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 1998;23(1):1-10.
31. Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem*. 1990;54(5):1798-801.
32. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. 1991;115(6):1725-35.
33. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(3):138-45.
34. Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation*. 2012;9:155.
35. Li L, Acioglu C, Heary RF, Elkabes S. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun*. 2021;91:740-55.
36. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
37. Becerra-Calixto A, Cardona-Gomez GP. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:88.
38. Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088:219-29.
39. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astroglial activation in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(10):3664-74.
40. Susarla BT, Villapol S, Yi JH, Geller HM, Symes AJ. Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. *ASN Neuro*. 2014;6(3):159-70.
41. McGeer PL, McGeer EG. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008;23(4):474-83.
42. Mena MA, Garcia de Yebenes J. Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *Neuroscientist*. 2008;14(6):544-60.
43. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(8):901-5.

44. Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):399-412.
45. Meda L, Baron P, Scarlato G. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging*. 2001;22(6):885-93.
46. Kashon ML, Ross GW, O'Callaghan JP, Miller DB, Petrovitch H, Burchfiel CM, et al. Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *J Alzheimers Dis*. 2004;6(6):595-604; discussion 73-81.
47. Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging*. 2010;31(4):578-90.
48. DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1998;149(2):329-40.
49. Durfinova M, Bartova R, Prochazkova L, Balco M, Liska B, Gavurnikova G. Role of astrocytes in pathogenesis of multiple sclerosis and their participation in regulation of cerebral circulation. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015;35(8):666-72.
50. Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen KL, Bethea JR. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*. 2014;62(3):452-67.
51. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(Pt 8):1953-71.
52. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(9):913-9.
53. Confavreux C, Vukusic S. The clinical course of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:343-69.
54. Wang D, Ayers MM, Catmull DV, Hazelwood LJ, Bernard CC, Orian JM. Astrocyte-associated axonal damage in pre-onset stages of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*. 2005;51(3):235-40.
55. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev*. 2012;248(1):170-87.
56. Laureys G, Gerlo S, Spooren A, Demol F, De Keyser J, Aerts JL. beta(2)-adrenergic agonists modulate TNF-alpha induced astrocytic inflammatory gene expression and brain inflammatory cell populations. *J Neuroinflammation*. 2014;11:21.
57. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013;61(4):453-65.
58. Correale J, Farez MF. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol*. 2015;6:180.
59. Zou J, Wang YX, Dou FF, Lu HZ, Ma ZW, Lu PH, et al. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochemistry international*. 2010;56(4):577-84.
60. Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem*. 1996;271(26):15303-6.
61. Ashwell K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991;58(1):1-12.
62. Rezaie P, Male D. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech*. 1999;45(6):359-82.
63. Katsumoto A, Lu H, Miranda AS, Ransohoff RM. Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *J Immunol*. 2014;193(6):2615-21.

64. Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med*. 2016;213(5):667-75.
65. Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol*. 1998;56(2):173-89.
66. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004;41(4):535-47.
67. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013;155(7):1596-609.
68. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):483-95.
69. Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*. 2011;7(1):47-53.
70. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987-91.
71. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*. 1989;491(2):394-7.
72. Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(1):251-8.
73. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778-83.
74. Kuno R, Wang J, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Neuroimmunol*. 2005;162(1-2):89-96.
75. Monif M, Reid CA, Powell KL, Drummond KJ, O'Brien TJ, Williams DA. Interleukin-1 $\beta$  has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):173.
76. Todd L, Palazzo I, Suarez L, Liu X, Volkov L, Hoang TV, et al. Reactive microglia and IL1 $\beta$ /IL-1R1-signaling mediate neuroprotection in excitotoxin-damaged mouse retina. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):118.
77. Finsen BR, Jorgensen MB, Diemer NH, Zimmer J. Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia*. 1993;7(1):41-9.
78. Weenink SM, Gautam AM. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(1):69-81.
79. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:441-68.
80. Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, Purohit D, Pasinetti GM. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers*. 2006;22(1-2):95-102.
81. Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*. 2003;106(6):518-26.
82. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988;38(8):1285-91.
83. Sun SW, Liang HF, Trinkaus K, Cross AH, Armstrong RC, Song SK. Noninvasive detection of cuprizone induced axonal damage and demyelination in the mouse corpus callosum. *Magn Reson Med*. 2006;55(2):302-8.

84. Voss EV, Skuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, et al. Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis.* 2012;45(1):519-28.
85. Li S, Gu X, Yi S. The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor-beta on Nerve Regeneration. *Cell Transplant.* 2017;26(3):381-94.
86. Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hovelmeyer N, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med.* 2005;11(2):146-52.
87. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist.* 2019;25(3):227-40.
88. Chen SH, Oyarzabal EA, Sung YF, Chu CH, Wang Q, Chen SL, et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia.* 2015;63(1):118-31.
89. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, et al. A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):99.
90. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
91. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature.* 2018;557(7707):724-8.
92. Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW, et al. NFkappaB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron.* 2015;85(1):101-15.
93. Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2016;36(2):577-89.
94. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2006;112(2):195-204.
95. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun.* 2009;23(3):309-17.
96. Norden DM, Fenn AM, Dugan A, Godbout JP. TGFbeta produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia.* 2014;62(6):881-95.
97. Holm TH, Draeby D, Owens T. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia.* 2012;60(4):630-8.
98. Takenaka MC, Guerreschi MG, Basso AS. Neuroimmune interactions: dendritic cell modulation by the sympathetic nervous system. *Semin Immunopathol.* 2016.
99. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:125-63.
100. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):595-638.
101. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 2003;421(6921):384-8.
102. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 2011;334(6052):98-101.

103. Chesik D, Glazenburg L, De Keyser J, Wilczak N. Enhanced proliferation of astrocytes from beta(2)-adrenergic receptor knockout mice is influenced by the IGF system. *J Neurochem.* 2007;100(6):1555-64.
104. Guerreschi MG, Araujo LP, Maricato JT, Takenaka MC, Nascimento VM, Vivanco BC, et al. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2013;43(4):1001-12.
105. Gavriilyuk V, Dello Russo C, Heneka MT, Pelligrino D, Weinberg G, Feinstein DL. Norepinephrine increases I kappa B alpha expression in astrocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29662-8.
106. Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, et al. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell.* 2004;14(3):303-17.
107. Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8603-7.
108. Takenaka MC, Araujo LP, Maricato JT, Nascimento VM, Guerreschi MG, Rezende RM, et al. Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through beta2-Adrenergic Receptor-Mediated Inhibition of NF-kappaB and AP-1 in Dendritic Cells. *J Immunol.* 2016;196(2):637-44.
109. Araujo LP, Maricato JT, Guerreschi MG, Takenaka MC, Nascimento VM, de Melo FM, et al. The Sympathetic Nervous System Mitigates CNS Autoimmunity via beta2-Adrenergic Receptor Signaling in Immune Cells. *Cell Rep.* 2019;28(12):3120-30 e5.
110. Dong JH, Chen X, Cui M, Yu X, Pang Q, Sun JP. beta2-adrenergic receptor and astrocyte glucose metabolism. *J Mol Neurosci.* 2012;48(2):456-63.
111. De Keyser J, Wilczak N, Leta R, Streetland C. Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors. *Neurology.* 1999;53(8):1628-33.
112. Subbarao KV, Hertz L. Effect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. *Brain Res.* 1990;536(1-2):220-6.
113. Fujita H, Tanaka J, Maeda N, Sakanaka M. Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neurosci Lett.* 1998;242(1):37-40.
114. Qian L, Wu HM, Chen SH, Zhang D, Ali SF, Peterson L, et al. beta2-adrenergic receptor activation prevents rodent dopaminergic neurotoxicity by inhibiting microglia via a novel signaling pathway. *J Immunol.* 2011;186(7):4443-54.
115. Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp.* 2013(71).
116. Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol.* 2010;20(5):588-94.
117. Fernandez D, Geisse A, Bernales JI, Lira A, Osorio F. The Unfolded Protein Response in Immune Cells as an Emerging Regulator of Neuroinflammation. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:682633.
118. Smith HL, Freeman OJ, Butcher AJ, Holmqvist S, Humoud I, Schatzl T, et al. Astrocyte Unfolded Protein Response Induces a Specific Reactivity State that Causes Non-Cell-Autonomous Neuronal Degeneration. *Neuron.* 2020;105(5):855-66 e5.
119. de Oliveira LG, Angelo YS, Yamamoto P, Carregari VC, Crunfi F, Reis-de-Oliveira G, et al. SARS-CoV-2 Infection Impacts Carbon Metabolism and Depends on Glutamine for Replication in Syrian Hamster Astrocytes. *bioRxiv.* 2021.