

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURAS DE ASTRÓCITOS  
HIPOTALÂMICOS DURANTE O ENVELHECIMENTO**

Camila Leite Santos

Orientador: Doutor André Quincozes dos Santos

Co-orientadora: Doutora Larissa Daniele Bobermin

Porto Alegre

2017

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE CULTURAS DE ASTRÓCITOS  
HIPOTALÂMICOS DURANTE O ENVELHECIMENTO**

Camila Leite Santos

Orientador: Doutor André Quincozes dos Santos

Co-orientadora: Doutora Larissa Daniele Bobermin

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

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Camila Leite

Caracterização morfofuncional de cultura de astrócitos hipotalâmicos durante o envelhecimento / Camila Leite Santos. -- 2017.

100 f.

Orientador: André Quincozes dos Santos.

Coorientador: Larissa Daniele Bobermin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Hipotálamo. 2. Astrócitos. 3. Envelhecimento. 4. Resposta Inflamatória. 5. Leptina. I. dos Santos, André Quincozes, orient. II. Bobermin, Larissa Daniele, coorient. III. Título.

Dedico esta dissertação aos meus pais, João Luiz e Girlane.

“Sou o que sou graças ao que somos todos nós”.

Desmond Tutu

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, João Luiz e Girlane, por serem pessoas simplesmente incríveis! Agradeço, principalmente, por todo o amor que me deram, que me dão e que ainda me darão, pois sem esse amor eu nada seria. Sou muito grata, também, por tudo que me ensinaram, por todo o apoio e pela torcida ao longo das minhas conquistas. Conheço alguns dos esforços que fizeram para que eu pudesse ter as melhores condições possíveis de vida, e só posso imaginar quantos outros esforços desconheço. Palavras nunca serão o suficiente para demonstrar toda minha gratidão e amor.

Ao meu orientador, André Quincozes, pela oportunidade e pelo aprendizado proporcionado, além de toda a paciência e calma em diversos momentos em que tais qualidades me faltaram.

À minha co-orientadora, Larissa, pelo aprendizado e pela ajuda em todas as etapas do mestrado: no fluxo, na bancada, na análise dos dados e na escrita desta dissertação. Agradeço também, pela agradabilíssima companhia ao longo deste processo.

Aos colegas de laboratório que se tornaram amigos para a vida, especialmente à Yasmine por todas as risadas, por todas as saudações ao sol, pelos “papos cabeça”, pelas confidências e pelos conselhos. Agradeço também à família mais querida e amada que o mestrado me apresentou: Aline, Adri e Bê muitíssimo obrigada pelo companheirismo, respeito, carinho e momentos felizes.

Aos ICs mais dedicados, queridos e divertidos que eu poderia ter encontrado: Paola e Pedro. Obrigada pela confiança, pela ajuda e por tudo que aprendi com

vocês, principalmente à Paola por ter acompanhado e auxiliado neste trabalho desde o início.

Aos colegas do laboratório 28, Priscila, Débora, Bruna, Rômulo, Fernanda e, também, aos colegas dos outros laboratórios pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração.

Às colegas de laboratório “gateiras” Jusse e Luciele, pela paciência e troca de experiências.

À minha irmã “de coração” Amanda por todo o amor, cumplicidade e luta. Agradeço à vida por tê-la colocado em meu caminho e espero que ela nos permita trilhar novos rumos sempre em companhia uma da outra.

Ao Augusto pela amizade e pela aprendizagem ao longo dos anos e, especialmente nestes últimos, pelo companheirismo, carinho, cuidado e pelas vivências compartilhadas.

Ao Chico, cuja presença nessa etapa da minha vida foi essencial. Agradeço pela paciência, pelas risadas, pelos devaneios, pelas trocas de experiências e pela ótima companhia de drinks em noites aleatórias.

Por fim, a todos que cruzaram o meu caminho, pois acredito que tais encontros fizeram me tornar quem eu sou e, portanto, sou grata.

## **SUMÁRIO**

### **PARTE I**

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUÇÃO .....	6
1. Hipotálamo.....	6
2. Envelhecimento e Homeostase Energética.....	7
3. Tipos Celulares do Hipotálamo.....	9
3.1. Astrócitos.....	10
3.1.1. Proteínas do Citoesqueleto Astrocitário.....	12
3.1.2. Metabolismo Glutamatérgico.....	13
3.1.3. Metabolismo da Glicose e Produção de Lactato.....	14
3.1.4. Suporte Trófico.....	15
3.1.5. Resposta Inflamatória.....	16
3.1.6. Vias de Sinalização Associadas à Funcionalidade Astrocitária..	18
4. Cultura Primária de Astrócitos.....	19
OBJETIVOS.....	21

### **PARTE II**

CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
-------------------------------------	----

### **PARTE III**

DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	77
PERSPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

## PARTE I

## RESUMO

O hipotálamo é uma região cerebral fundamental na detecção e na integração de sinais nutricionais e hormonais da periferia, proporcionando mudanças fisiológicas adequadas para a manutenção da homeostase energética, além de estar envolvido em outras funções essenciais aos organismos, tais como a regulação do balanço energético, da temperatura corporal, do ritmo circadiano e da reprodução. O hipotálamo também é uma estrutura crucial durante o envelhecimento, em virtude do papel dominante que desempenha no organismo e, considerando-se o aumento da expectativa de vida da população mundial, entender as alterações ocorridas nesta região cerebral pode ajudar a elucidar mecanismos patofisiológicos de doenças neurometabólicas, bem como levar a uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos. Os astrócitos hipotalâmicos desempenham várias funções que podem afetar diretamente a homeostase energética, pois estas células estão envolvidas na detecção e no transporte de nutrientes, e expressam receptores para hormônios metabólicos e neuropeptídios, podendo modular a atividade dos neurônios responsáveis pelo controle do apetite e saciedade. Além disso, este tipo celular participa da resposta inflamatória na região hipotalâmica, podendo levar à resistência à leptina e à intolerância à glicose. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar as características morfofuncionais de culturas primárias de astrócitos hipotalâmicos de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e envelhecidos (1-2 dias, 90 dias e 180 dias, respectivamente). Foram observadas alterações idade-dependentes na regulação da homeostase glutamatérgica, biossíntese da glutatona, perfil de aminoácidos, metabolismo da glicose, suporte trófico, resposta inflamatória e sensibilidade à leptina. Além disso, verificou-se que importantes vias de sinalização, tais como Nrf-2/HO-1, p38 MAPK, NFκB, COX-2, iNOS e PI3K/Akt, apresentaram alterações com o passar da idade. Portanto, este estudo evidencia que a capacidade homeostática dos astrócitos hipotalâmicos se mostra alterada ao longo do processo de envelhecimento e que, conseqüentemente, estas células podem estar envolvidas no desenvolvimento de distúrbios metabólicos, tornando-se alvos terapêuticos em potencial.

## **ABSTRACT**

The hypothalamus is a fundamental brain region in the detection and integration of nutritional and hormonal signals from the periphery, providing adequate physiological changes to maintain energy homeostasis, besides being involved in other essential functions to the organisms, such as: energy balance, temperature, circadian rhythm and reproduction. Additionally, the hypothalamus is crucial in the aging process, due its neurometabolic role, and considering the extending human life span, understanding the changes in this brain region might contribute to elucidate the patho(physio)logical mechanisms of neurometabolic diseases, as well as might improve the healthy of individuals. Hypothalamic astrocytes perform various functions that may directly affect energy homeostasis, since these cells are involved in the detection and transport of nutrients, and express receptors for metabolic hormones and neuropeptides, thus modulating the activity of neurons responsible for controlling appetite and satiety. In addition, these cells participate in the inflammatory response in the hypothalamic region, and may lead to leptin resistance and glucose intolerance. Thus, the aim of this study was to evaluate the morphofunctional properties of primary cultures of hypothalamic astrocytes from newborn, adult and aged Wistar rats (1-2 days, 90 days and 180 days, respectively). Age-dependent changes in the regulation of glutamatergic homeostasis, glutathione biosynthesis, amino acid profile, glucose metabolism, trophic support, inflammatory response and leptin sensitivity were observed. Furthermore, important signaling pathways, such as Nrf-2/HO-1, p38 MAPK, NFκB, COX-2, iNOS and PI3K/Akt, changed with age. Therefore, this study showed that the homeostatic capacity of hypothalamic astrocytes is altered throughout the aging process and that, consequently, these cells may be involved in metabolic disorders, becoming potential therapeutic targets.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -MSH	Hormônio estimulador de melanócitos $\alpha$ (do inglês “ $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone”)
AgRP	Peptídeo relacionado ao gene agouti (do inglês “Agouti-related protein”)
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês “Brain-derived neurotrophic factor”)
COX-2	Ciclooxigenase-2
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios (do inglês “Excitatory amino acid transporter”)
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês “Glial-derived neurotrophic factor”)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (do inglês “Glial fibrillary acidic protein”)
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato (do inglês “Glutamate-aspartate transporter”)
GLT-1	Transportador de glutamato tipo 1 (do inglês “Glutamate transporter 1”)
GLUTs	Transportadores de glicose (do inglês “Glucose transporters”)
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês “inducible Nitric oxide synthase”)

LepR	Receptor de leptina (do inglês “Leptin receptor”)
MAPK	Proteínas cinase ativadas por mitógenos (do inglês “Mitogen-activated protein kinase”)
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês “Monocyte chemotatic protein-1”)
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês “Mammalian target of rapamycin”)
NFκB	Fator de transcrição nuclear κB (do inglês “Nuclear factor κB”)
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
Nrf-2	Fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (do inglês “Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2”)
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinase (do inglês “Phosphatidylinositol 3-kinase”)
POMC	Pró-ópiomelanocortina
SNC	Sistema nervoso central
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β (do inglês “Transforming growth factor β”)
TNF-α	Fator de necrose tumoral α (do inglês “Tumor necrosis factor α”)

## **INTRODUÇÃO**

### **1. Hipotálamo**

Uma condição fundamental para a sobrevivência de um organismo é a capacidade de manter seu metabolismo energético regulado adequadamente, já que em momentos de escassez de alimentos as reservas energéticas corporais, acumuladas em épocas de abundância nutricional, devem ser mobilizadas para suprir as necessidades metabólicas (Waterson & Horvath, 2015).

O cérebro é um órgão crucial para o metabolismo, com várias regiões anatômicas reconhecidas por desempenharem papéis chave na homeostase metabólica. No entanto, o hipotálamo se destaca por ser fundamental na detecção e integração de sinais da periferia e por proporcionar mudanças fisiológicas adequadas para a manutenção deste processo, além de estar envolvido em outras funções essenciais aos organismos, tais como: balanço energético, temperatura corporal, ritmo circadiano e reprodução, sendo considerado o principal centro integrador de sinais hormonais e nutricionais do sistema nervoso central (SNC) (Coll & Yeo, 2013; Schneeberger et al., 2014; Cornejo et al., 2016). Esta é uma estrutura evolutivamente antiga situada acima da glândula pituitária e dividida em diferentes regiões, sendo que cada uma delas possui um grupo específico de células que regula diferentes papéis fisiológicos e/ou comportamentais (Migaud et al., 2010; Burbridge et al., 2016).

Para exercer as funções citadas acima, o hipotálamo precisa ser informado sobre as condições corporais para poder regulá-las, e ele recebe essas indicações a partir de hormônios e de sinais metabólicos enviados pelos tecidos periféricos através da corrente sanguínea. Um destes hormônios é a leptina, que é produzida e secretada principalmente pelos adipócitos e possui um papel anorexígeno, sendo que seus níveis na corrente sanguínea apresentam relação direta com a quantidade de gordura corporal (Niswender et al., 2001; Flak & Myers, 2016). Portanto, o principal papel da leptina é informar para o SNC, especialmente ao hipotálamo, sobre o tamanho do estoque energético no tecido adiposo e, assim, regular a ingestão alimentar e o gasto energético (Blüher & Mantzoros, 2009). Pacientes

obesos geralmente apresentam um estado de resistência à leptina, que se caracteriza pela incapacidade deste hormônio, mesmo em altas concentrações no sangue, de exercer seu poder anorexígeno (Schneeberger et al., 2014).

A glicose e os produtos finais da glicólise, como o lactato, são importantes combustíveis metabólicos que influenciam a regulação hipotalâmica da homeostase energética e, além disso, podem agir como sinais metabólicos que informam o hipotálamo acerca das condições nutricionais do organismo. O metabolismo central da glicose tem sido estabelecido como um importante regulador da alimentação, pois a infusão intracerebroventricular deste substrato energético, a longo prazo, causa uma redução do peso corporal atribuída a uma redução da ingestão alimentar. Trabalhos recentes têm delineado os mecanismos subjacentes aos efeitos anorexígenos da administração central tanto de glicose quanto de lactato (Cornejo et al., 2016; Roh & Kim, 2016).

Indivíduos saudáveis mantêm um balanço adequado entre a ingestão de alimentos e o gasto energético e, quando este balanço é alterado pela inaptidão do cérebro em controlar a homeostase energética, podem-se desenvolver, como consequência, situações patológicas como a hiperfagia e a obesidade (Morton et al., 2006). Uma condição que pode levar a complicações na manutenção da homeostasia energética é a inflamação, que é característica do envelhecimento, de diversas doenças neurodegenerativas e, também, de doenças ligadas à síndrome metabólica, como a obesidade (Valdearcos et al., 2015). Tradicionalmente, já se conhece o papel do excesso calórico na inflamação hipotalâmica, porém, recentemente, está se desenvolvendo uma nova abordagem que leva em consideração o envelhecimento, independente do estado nutricional do indivíduo, na promoção desta condição (Tang et al., 2015).

## **2. Envelhecimento e Homeostase Energética**

Durante o século XX, a expectativa de vida humana aumentou em aproximadamente 30 anos em consequência da melhora da saúde pública, das tecnologias médicas e da nutrição, e a Organização Mundial da Saúde estima que o

número de idosos, indivíduos acima de 65 anos, irá triplicar nas próximas décadas (Christensen et al., 2009; Gupta & Morley, 2014).

O envelhecimento é um processo natural, complexo e multifatorial, que leva a perda gradual das funções normais do corpo, inclusive do cérebro, acompanhada por uma diminuição na capacidade de resposta ao estresse e por um risco aumentado de morbidade e de mortalidade (Kirkwood, 2005). Apesar de existirem diferentes teorias sobre o envelhecimento, atualmente é aceito que a sua principal causa é o acúmulo gradual de danos moleculares e celulares como, por exemplo, irregularidades nos cromossomos, reparação deficiente do DNA e encurtamento dos telômeros, além de outras causas fisiológicas tais como, desequilíbrio hormonal, consumo excessivo de calorias, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação (Vijg & Campisi, 2008; Wilson et al., 2008; Gems & Partridge, 2013). Entretanto, estes mecanismos necessitam ser melhor elucidados para se entender as diferenças entre o envelhecimento saudável e o desenvolvimento de doenças relacionadas a este processo. Inclusive já foi demonstrado, em ratos, um aumento idade-dependente com relação à intolerância à glicose, a marcadores inflamatórios, aos níveis de lipídeos e de insulina circundantes. Este aumento ocorreu entre o primeiro e o vigésimo quarto mês de vida e, com a expansão da longevidade humana, há um crescente interesse na pesquisa para se prevenir ou, pelo menos, atrasar essas disfunções associadas ao envelhecimento (Bass et al., 2013).

Uma das mudanças causadas pelo envelhecimento que recentemente está recebendo a atenção dos pesquisadores é a inflamação hipotalâmica, pois ela pode causar alterações no metabolismo energético e, por consequência, na homeostase energética, que levam ao aumento da massa corporal, intolerância à glicose e resistência à leptina (Kmiec, 2010; Thaler et al., 2013; Jais & Brüning, 2017). A resistência à leptina é um fenômeno que pode ocorrer devido a uma deficiência congênita, ou defeitos estruturais dos seus receptores ou do próprio hormônio. Este evento pode ser induzido tanto pela obesidade quanto pelo envelhecimento sem o prévio aumento da massa corporal, indicando que a idade tem a capacidade de causar a resistência à leptina que, conseqüentemente, pode desencadear diversas alterações metabólicas (Ma et al., 2002; Rostás et al., 2016).

Assim, estruturas como o hipotálamo são cruciais no processo de envelhecimento, em virtude do papel dominante que desempenham no organismo e, considerando-se o aumento da expectativa de vida da população mundial, entender as alterações ocorridas nesta região cerebral pode levar a uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos (Oeppen & Vaupel, 2002; White, 2002; Chen et al., 2015). Para isso, é importante se ter ferramentas disponíveis que possibilitem o estudo cerebral durante o envelhecimento.

### **3. Tipos Celulares do Hipotálamo**

Como mencionado anteriormente, o hipotálamo é considerado o principal centro integrador de sinais hormonais e nutricionais do SNC, e esta região apresenta dois tipos neuronais particulares: os neurônios orexígenos e os neurônios anorexígenos, que monitoram continuamente os sinais que refletem o estado energético do organismo. Os neurônios orexígenos sintetizam o peptídeo relacionado ao gene *agouti* (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY), enquanto os neurônios anorexígenos produzem e liberam o hormônio estimulador de melanócitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), um peptídeo derivado do precursor pró- $\alpha$ -melanocortina (POMC) (Meister et al., 2013). Evidências experimentais demonstram que quando estimulados seletivamente, através de mecanismos optogenéticos, os neurônios NPY/AgRP evocam a alimentação intensa, sendo que abordagens genéticas semelhantes revelaram que as células POMC têm exatamente as ações opostas no controle da homeostase energética (Kelly & Rønnekleiv, 2015).

Além dos neurônios, as células da glia são encontradas na região hipotalâmica. A princípio, este grupo composto por diversos tipos celulares foi considerado detentor de um papel passivo no SNC, uma estrutura que preenchia espaços não ocupados pelas células neuronais (Kettenmann & Verkhratsky, 2008). Porém, através de diversos estudos ao longo dos anos, foram se desvendando as várias funções cruciais em que a glia está envolvida (Allen & Barres, 2009). Este grupo é constituído pelas células da microglia – envolvidas na resposta imune cerebral –, pelos oligodendrócitos – encarregados pela formação da bainha de mielina dos neurônios –, pelas células ependimais – responsáveis pelo revestimento dos ventrículos cerebrais –, e pelos astrócitos, que serão abordados com maior

detalhamento no próximo tópico (Perea & Araque, 2005; Barres, 2008; Jha & Suk, 2013).

Com um conhecimento mais aprofundado sobre as células gliais, pode-se ter uma melhor compreensão não somente acerca dos eventos fisiológicos, mas também sobre os eventos patológicos em que estas células estão envolvidas, possibilitando, inclusive, a identificação de novos alvos terapêuticos para diversas condições neurológicas.

### **3.1. Astrócitos**

Os astrócitos são células que apresentam um papel fundamental em diversas funções essenciais para a manutenção da homeostasia do SNC como, por exemplo, a regulação de neurotransmissores, do metabolismo energético, da secreção de fatores tróficos, de defesas antioxidantes e da resposta inflamatória (Hertz & Zielke, 2004; Farina et al., 2007; Bélanger et al., 2011; Fernandez-Fernandez et al., 2012).

Este tipo celular está em estreita ligação com vários componentes do parênquima cerebral, incluindo neurônios, vasos sanguíneos, matriz extracelular e outras populações gliais (Gonzalez-Perez et al., 2015). Os astrócitos mantêm suas projeções celulares em contato tanto com os neurônios quanto com os vasos sanguíneos, possibilitando o monitoramento do ambiente ao seu entorno e, também, permitindo-os responder dinamicamente a alterações fisiopatológicas, sendo que algumas delas serão elucidadas nos próximos parágrafos (Teschmacher et al., 2015).

Com relação ao contato com os neurônios, os astrócitos têm a capacidade de modular vários aspectos da função neuronal incluindo: a sinaptogênese, a plasticidade sináptica, o metabolismo e a sobrevivência neuronal, a homeostase do ambiente iônico extracelular e do pH, e a regulação do metabolismo glutamatérgico. Essas atividades são realizadas através da comunicação direta e bidirecional com os neurônios, o que é essencial para o funcionamento normal do cérebro (Wang & Bordey, 2008; García-Cáceres et al., 2013; De Pittà et al., 2016).

No hipotálamo, os astrócitos desempenham variadas atividades que podem afetar diretamente a homeostase energética, pois estas células estão envolvidas na detecção e no transporte de nutrientes, expressam receptores para hormônios metabólicos e neuropeptídeos e respondem a estímulos que podem afetar diretamente os neurônios responsáveis pelo controle da homeostasia energética (Hsuchou et al., 2009; Bélanger et al., 2011; Leloup et al., 2015). Além disso, este tipo celular participa da resposta inflamatória na região hipotalâmica, podendo levar à resistência à leptina e à intolerância à glicose, como comentado anteriormente (Schneeberger et al., 2014; Jais & Brüning, 2017).

Sobre o monitoramento do metabolismo energético, podemos ressaltar que os astrócitos estão entre as primeiras células do SNC a avaliar a quantidade de glicose disponível na periferia e, junto com os neurônios, eles são capazes de responder a este estímulo alterando o comportamento alimentar do indivíduo. Este processo é importante para a manutenção tanto dos níveis de glicose sistêmica quanto cerebral (Argente-Arizón et al., 2015). Além disso, ainda com relação ao metabolismo energético, podemos citar a expressão de receptores de leptina (LepR) pelas células astrocíticas, sugerindo que elas são capazes de responder a mudanças no estoque energético presente no tecido adiposo e, conseqüentemente, regular a atividade neuronal (Hsuchou et al., 2009). Quando há uma exposição prolongada à leptina, células da glia produzem diversas citocinas, podendo levar à inflamação e à resistência a este hormônio (Cheunsuang & Morris, 2005; García-Cáceres et al., 2011). Em astrócitos hipotalâmicos, este hormônio tem a capacidade de modificar diversos aspectos da funcionalidade astrocítica que serão abordadas posteriormente, incluindo a expressão de proteínas do citoesqueleto, dos transportadores de glutamato e de glicose, dependendo de sua concentração e do tempo de exposição (García-Cáceres et al., 2011; Fuente-Martin et al., 2012).

O rápido aumento da obesidade e das doenças relacionadas a esta condição contribuíram para o interesse nos mecanismos neuroendócrinos relacionados ao metabolismo e, como consequência, estudos que levam em consideração o papel das células gliais no controle metabólico estão sendo desenvolvidos.

### **3.1.1. Proteínas do Citoesqueleto Astrocitário**

As células animais possuem, no seu citoplasma, um citoesqueleto formado por proteínas de microfilamentos – a actina – de microtúbulos – a tubulina – e de filamentos intermediários. Esta estrutura é responsável por diversas funções fisiológicas, dentre as quais a manutenção da forma celular, da citoarquitetura e da estabilidade mecânica, processos que são grandemente afetados durante o envelhecimento (Menet et al., 2001; Middeldorp & Hol, 2011). Contudo, um aumento na expressão de certas proteínas do citoesqueleto é determinante na contribuição da formação da cicatriz glial durante o processo de astrogliose reativa, mostrando que elas também podem desempenhar atividades em situações patológicas (Pekny et al., 2016).

Uma das proteínas que formam esta estrutura é a actina, amplamente distribuída em variados tipos celulares, tanto no SNC quanto na periferia. Ela é a principal determinante da morfologia celular e está, também, envolvida na motilidade, migração e adesão celular, e o comprometimento da polimerização do citoesqueleto de actina altera muitas funções reguladas pelos astrócitos como, por exemplo, o crescimento celular e a captação de glutamato. Em cultura primária de astrócitos, a actina se apresenta em um arranjo clássico com fibras de estresse organizadas paralelamente (Perez et al., 2005; Souza et al., 2013).

Dentre as proteínas que formam os filamentos intermediários, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina são importantes componentes do citoesqueleto em células astrocitárias, e são amplamente usadas como marcadores deste tipo celular. Com relação à GFAP, ela é a principal proteína constituinte dos filamentos intermediários nos astrócitos, responsável pela estrutura celular, pela manutenção da força mecânica e pelo suporte estrutural dado aos neurônios e à barreira sangue-cérebro. Astrócitos imaturos também expressam a proteína vimentina, que é essencial no princípio do desenvolvimento cerebral, sendo substituída progressivamente pela GFAP ao longo do processo de diferenciação celular. Entretanto, não há uma substituição completa e a vimentina continua sendo expressa no cérebro envelhecido, inclusive em quantidades significativas (Pekny, 2001; Bramanti et al., 2010).

### 3.1.2. Metabolismo Glutamatérgico

O glutamato é um aminoácido não-essencial e o mais importante neurotransmissor excitatório do SNC, estando envolvido em variadas e numerosas funções cerebrais, tais como: formação e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte neuronal, bem como, regulação do metabolismo energético (Luján et al., 2005; Santello & Volterra, 2009; Parpura & Verkhratsky, 2012; De Pittà & Brunel, 2016). Embora normalmente sejam os terminais sinápticos neuronais os principais responsáveis pela liberação do glutamato para o meio extracelular, atualmente sabe-se que os astrócitos também podem fazê-lo, constituindo o processo de gliotransmissão. Este evento pode ter funções de sinalização, mas em contextos patológicos, o aumento da liberação de glutamato pelos astrócitos pode auxiliar a ocorrência da excitotoxicidade neuronal (Parpura & Verkhratsky, 2012).

Os astrócitos também possuem a capacidade de controlar a transmissão sináptica glutamatérgica por meio da captação desse neurotransmissor a partir da fenda sináptica, através de transportadores específicos presentes em sua membrana. No cérebro de roedores, os principais transportadores são o transportador de glutamato-aspartato (GLAST) e o transportador de glutamato tipo 1 (GLT-1) sendo que eles são homólogos aos transportadores de aminoácidos excitatórios humanos EAAT1 e EAAT2, respectivamente (Danbolt, 2001; Murphy-Royal et al., 2017).

Após ser captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser convertido à glutamina pela enzima glutamina sintetase (GS), por uma reação dependente de adenosina trifosfato (ATP). A glutamina gerada é enviada para o meio extracelular, de onde pode ser captada pelos terminais pré-sinápticos e utilizada na síntese do glutamato pelas células neuronais (Eisenberg et al., 2000; Rose et al., 2013), formando o ciclo glutamato-glutamina. Este ciclo promove uma relação metabólica extremamente importante entre astrócitos e neurônios, pois o neurotransmissor glutamato, que é excitotóxico e pode causar efeitos nocivos em determinadas condições, é transportado de uma forma neutra e segura de volta aos neurônios (Hertz et al., 1999; Parpura & Verkhratsky, 2012).

Outro possível destino para o glutamato é a sua união com os aminoácidos cisteína e glicina para a síntese da glutathiona (GSH), um antioxidante não-enzimático importante na proteção do SNC contra danos promovidos pelo estresse oxidativo. Uma enzima chave neste processo é a glutamato-cisteína ligase (GCL) que realiza o primeiro passo, conjugando o glutamato com a cisteína. Posteriormente outra enzima, a glutathiona sintase, adiciona a glicina para finalizar a formação do tripeptídeo (Dringen et al., 2014).

Além disso, os neurônios são dependentes dos astrócitos para produzir sua própria GSH, pois apesar de ambos serem capazes de gerar este antioxidante, as células neuronais necessitam que os astrócitos as abasteçam com precursores para a sua síntese, devido ao fato de elas não conseguirem utilizar a cistina (forma oxidada do aminoácido cisteína) do meio extracelular. Portanto, parte da GSH sintetizada pelos astrócitos é enviada para o meio extracelular, onde ela é clivada enzimaticamente em seus aminoácidos constituintes que, por fim, são captados pelos neurônios e utilizados para a síntese neuronal de GSH (Fernandez-Fernandez et al., 2012; Schmidt & Dringen, 2012; Lu, 2013).

### **3.1.3. Metabolismo da Glicose e Produção de Lactato**

Como dito anteriormente, o metabolismo da glicose nos astrócitos é uma importante característica relacionada à sua funcionalidade. Apesar de a glicose consistir no substrato energético obrigatório para o cérebro, outros substratos também podem ser utilizados pelas células gliais e neuronais, incluindo: lactato, piruvato, glutamato e glutamina (Bélanger et al., 2011). O lactato produzido pelos astrócitos tem sido recentemente alvo de estudos que indicam que ele representa uma considerável fonte energética para o cérebro (Bouzier-Sore & Pellerin, 2013; Stobart & Anderson, 2013). Além disso, existe uma relação entre a captação de glutamato, a glicólise e a produção de lactato. Quando há um aumento na demanda energética neuronal relacionada a uma intensa atividade dessas células, os astrócitos aumentam o transporte e a utilização da glicose em resposta ao aumento da captação de glutamato e, conseqüentemente, ocorre uma maior produção de lactato, que é enviado aos neurônios onde é convertido a piruvato e metabolizado

oxidativamente com o intuito de gerar mais energia (Caesar et al., 2008; Zielke et al., 2009).

Tanto a glicose quanto o lactato, além de serem importantes substratos energéticos, também influenciam a regulação hipotalâmica da homeostase energética, já que a administração central destes dois substratos leva a alterações metabólicas e comportamentais, como a redução do peso devido a uma diminuição da ingestão de alimentos, demonstrando seus efeitos anorexígenos (Davis et al., 1981; Cornejo et al., 2016; Roh & Kim, 2016).

#### **3.1.4. Suporte Trófico**

Os astrócitos podem sintetizar e secretar fatores tróficos fundamentais para a sobrevivência, maturação e proliferação neuronal ao longo do desenvolvimento (Villegas et al., 2003). Dentre estes fatores podemos citar o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e a proteína S100B (Skaper, 2012).

Desde a sua purificação, em 1982, muitos estudos evidenciaram a importância do BDNF no SNC, em situações fisiológicas e patológicas. Além da sua influência no desenvolvimento neuronal e na sobrevivência celular, este fator trófico parece ser essencial aos mecanismos moleculares da plasticidade sináptica (Gray et al., 2006; Cordeira & Rios, 2011; Fulmer et al., 2014)

A partir da década de 90, quando o GDNF foi isolado, estudos demonstraram que este é um potente fator trófico para o desenvolvimento, sobrevivência e manutenção de neurônios dopaminérgicos. Além disso, existem evidências de que níveis reduzidos de GDNF induzem a liberação excessiva de glutamato e, também, desregulam os transportadores deste neurotransmissor, causando excitotoxicidade no SNC (Budni et al., 2015; Farrand et al., 2015).

O TGF- $\beta$  é uma molécula essencial na regulação de eventos-chave durante o desenvolvimento, em condições patológicas e no reparo. As numerosas funções celulares e teciduais exercidas por este fator trófico incluem: controle do ciclo

celular, regulação do desenvolvimento, da diferenciação celular, da formação da matriz extracelular, da angiogênese e da resposta imune (Kriegstein et al., 2002).

Outro fator trófico importante é a proteína S100B, que é produzida e secretada predominantemente pelos astrócitos no SNC e desempenha suas atividades tanto intra quanto extracelularmente. No meio intracelular, esta proteína se localiza no citoplasma e age estimulando a proliferação, a migração e a diferenciação celular durante o desenvolvimento cerebral, além de participar da modulação do citoesqueleto e na degradação de proteínas. No meio extracelular, essa proteína pode exercer tanto efeitos autócrinos quanto parácrinos sobre os neurônios e outras células da glia (Donato et al., 2009; Donato et al., 2013). Quando secretada em grande quantidade, a S100B é capaz de estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, de induzir a apoptose e, em modelos animais, de causar alterações comportamentais e déficits cognitivos (Rothermundt et al., 2003).

### **3.1.5. Resposta Inflamatória**

O cérebro, assim como os tecidos periféricos, produz uma reação inflamatória contra patógenos e debris celulares para promover sua remoção, mas esta reação também ocorre naturalmente durante o envelhecimento. A resposta inflamatória no cérebro pode ser aguda ou crônica e se dá através da ativação da microglia e dos astrócitos, com a secreção de mediadores inflamatórios, a ativação de determinadas vias de sinalização e a alteração do estado fisiológico (Hauwel et al., 2005; Lynch et al., 2010).

Os astrócitos são capazes de produzir e secretar moléculas pró-inflamatórias com o intuito de recrutar outros elementos envolvidos com o processo inflamatório (Gao et al., 2013, Sofroniew, 2014). Todavia, algumas destas moléculas comumente apresentam um papel duplo, podendo estar envolvidas em eventos fisiológicos ou patológicos, dependendo do tipo de estímulo, de sua intensidade e do seu tempo de exposição. Em condições fisiológicas, encontramos níveis basais de citocinas pró-inflamatórias – como, por exemplo, as interleucinas 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 6 (IL-6), 18 (IL-18), o fator de necrose celular  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) –, mas a presença de mediadores conhecidos pelo seu papel anti-inflamatório –

como, por exemplo, a interleucina 10 (IL-10) – predomina e o inverso ocorre em situações patológicas, com níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e uma diminuição nas concentrações de moléculas com perfil anti-inflamatório (Jensen et al., 2013).

A expressão do fator de transcrição nuclear kB (NFkB) é abundante no cérebro e ele é considerado o principal mediador inflamatório por ser um regulador de diversas vias de sinalização que regem a transcrição de genes que codificam citocinas, quimiocinas e enzimas pró-inflamatórias. Por isso, a modulação da sua atividade durante o processo inflamatório é um alvo terapêutico interessante para se evitar a geração de grandes quantidades de mediadores que possam agravar o dano às células. O NFkB regula a expressão de mais de 500 genes diferentes, incluindo o da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2009; Shih et al., 2015).

Relacionada à atividade do NFkB, regulando sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, a resposta inflamatória, está a via de sinalização das proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK). Esta via participa no processo de astrogliose reativa, na infiltração de células do sistema imune e na resposta imune adaptativa (Kaminska et al., 2009). Existem indícios de que a ativação da via p38 MAPK está fortemente ligada à senescência de astrócitos, porém os mecanismos moleculares que levam a este processo ainda precisam ser melhor elucidados (Mombach et al., 2015).

Células gliais têm a capacidade de produzir óxido nítrico (NO) através da iNOS, em resposta a uma variedade de estímulos tais como, citocinas, patógenos, toxinas e compostos endógenos produzidos durante a injúria cerebral. O NO desempenha funções fisiológicas essenciais para o SNC, entretanto quando presente em excesso, esta molécula é prejudicial e tem relação com doenças neurodegenerativas (Ghasemi & Fatemi, 2014).

Desde seu descobrimento, nos anos 90, a ciclooxigenase na sua forma induzível (COX-2) emergiu como um importante agente nas reações inflamatórias nos tecidos periféricos e, posteriormente, essa ação foi também observada no

cérebro. Ela é rapidamente expressa em vários tipos celulares em resposta a citocinas e moléculas pró-inflamatórias, estando envolvida na síntese de prostaglandinas, e com o desenvolvimento de processos neurodegenerativos (Minghetti, 2004). Ademais, a expressão da COX-2 pode ser modulada pelo NFκB, e a indução da COX-2 leva à inibição da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K), causando por fim uma redução na transcrição do gene do fator eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) (Wakabayashi et al., 2010).

### **3.1.6. Vias de Sinalização Associadas à Funcionalidade Astrocitária**

Além das vias de sinalização envolvidas na promoção da resposta inflamatória pelos astrócitos, diversas vias de sinalização celular têm sido associadas a efeitos citoprotetores, os quais podem estar relacionados com uma adequada funcionalidade astrocitária.

Neste sentido, a via de sinalização do Nrf-2 confere efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de diversas doenças e também é capaz de proteger os astrócitos contra injúrias como, por exemplo, as causadas pelo estresse oxidativo e pela toxicidade do peróxido de hidrogênio (Dowell & Johnson, 2013). O papel citoprotetor desse fator de transcrição é desempenhado pela regulação de genes relacionados às funções antioxidante, anti-inflamatória e, também, à autofagia (Wakabayashi et al., 2010; Yamazaki et al., 2015). O Nrf-2 induz a ativação do gene para a enzima heme oxigenase 1 (HO-1), sua forma induzível, a qual está relacionada com a ativação de mecanismos de defesa celulares frente a diferentes estímulos estressores. A HO-1 é responsável pela conversão do grupamento heme em monóxido de carbono, biliverdina e bilirrubina, as quais possuem atividade antioxidante (Cuadrado & Rojo, 2008; Quincozes-Santos et al., 2014). Nosso grupo tem demonstrado o papel da HO-1 na modulação de diferentes funções associadas aos astrócitos, como a captação de glutamato, a manutenção de defesas antioxidantes e a resposta inflamatória, desempenhando, assim, um importante papel na glioproteção (Bobermin et al., 2015; Bellaver et al., 2016a; Souza et al., 2016; Arús et al., 2017).

Outra via fundamental para processos celulares vitais como o controle do metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, migração celular, e para o transporte e secreção através de membranas, é a PI3K. A ativação desta via leva à fosforilação da Akt que, por sua vez, ativa a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), formando a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, que é reconhecida pelo seu papel no crescimento celular e na inibição da morte celular. Assim, alterações no seu funcionamento normal estão relacionadas à inflamação, doenças metabólicas e cardiovasculares, e ao câncer (Cantley, 2002; Wymann et al., 2003). Além disso, uma das vias recrutadas pela ativação dos receptores de leptina é a PI3K, alterando propriedades celulares de forma rápida através da fosforilação de proteínas. Estudos revelaram que esta via é essencial para que a leptina provoque seus efeitos agudos, como a restrição da ingestão de alimentos após o aumento dos níveis deste hormônio (Donato et al., 2010).

#### **4. Cultura Primária de Astrócitos**

Levando-se em consideração o papel relevante dos astrócitos para a manutenção da homeostasia do SNC, incluindo o hipotálamo, é importante que haja ferramentas adequadas ao estudo deste tipo celular e uma delas é a cultura primária.

Durante as últimas décadas, grande parte da nossa compreensão sobre os astrócitos tem sido obtida através de estudos realizados com culturas primárias deste tipo celular. Tal ferramenta tem sido de um valor inestimável para se estudar os papéis dos astrócitos em estados fisiológicos e patológicos, e muitas funções centrais no metabolismo, na neurotransmissão e na sinalização de cálcio foram descobertas a partir de sua utilização. A maioria destas observações foram subsequentemente encontradas *in vivo* e muitas destas descobertas não teriam sido possíveis sem a utilização de cultura de células (Lange et al., 2012).

Estudos que aplicam esta técnica normalmente utilizam o cérebro de animais neonatos, porém para se analisar as alterações provocadas pelo envelhecimento, seria mais pertinente o emprego do cérebro de animais maduros, já que este possui conexões melhor estabelecidas e é menos plástico do que o de neonatos. Assim

sendo, o uso de culturas primárias de astrócitos de animais adultos e envelhecidos tem a capacidade de proporcionar um melhor entendimento sobre o processo de envelhecimento cerebral, podendo ser estudados diversos parâmetros tanto fisiológicos quanto patológicos, bem como alterações metabólicas ao longo do desenvolvimento (Lange et al., 2012; Souza et al., 2013; Bellaver et al., 2016b).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar as possíveis alterações ocorridas na morfofuncionalidade astrocitária durante o envelhecimento através da utilização da cultura de astrócitos hipotalâmicos de ratos Wistar, com o intuito de elucidar o papel destas células ao longo deste processo.

### **Objetivos Específicos**

- Realizar a caracterização das culturas de astrócitos hipotalâmicos obtidas a partir de animais neonatos, adultos e envelhecidos;
- Descrever o perfil de concentração extracelular de diferentes aminoácidos;
- Analisar parâmetros relacionados ao metabolismo glutamatérgico astrocitário, incluindo a captação e os níveis extracelulares de glutamato, bem como a expressão dos transportadores GLAST e GLT-1, a atividade da GS, os níveis intracelulares de GSH e a atividade da enzima GCL;
- Verificar a captação de glicose, bem como a produção e a liberação de lactato;
- Medir a secreção de fatores tróficos;
- Avaliar a resposta inflamatória;
- Investigar a participação de vias de sinalização nas possíveis alterações da resposta astrocitária decorrentes da idade;
- Analisar a expressão dos receptores de leptina, bem como o efeito da exposição à leptina na resposta inflamatória.

## PARTE II

**Age-dependent functional reprogramming of hypothalamic astrocyte cultures:  
possible mechanisms for disturbances in energy homeostasis**

Camila Leite Santos, Bruna Bellaver, Débora Guerini Souza, Paola Haack Amaral  
Roppa, Pedro Truccolo, Fernanda Urruth Fontella, Diogo Onofre Souza, Larissa  
Daniele Bobermin, André Quincozes-Santos

Artigo a ser submetido

## PARTE III

## DISCUSSÃO

Um importante regulador da homeostasia metabólica em animais é o hipotálamo, e neuropeptídeos relacionados com esta região cerebral foram encontrados desde os primeiros ramos basais a divergirem na evolução de metazoários – animais pluricelulares – bem como, nos gânglios de corais e de moluscos (Twan et al., 2006; Takayanagi & Onaka, 2010). Além disso, foram descobertas estruturas análogas ao hipotálamo em anelídeos e em peixes (Tessmar-Raible et al., 2007), indicando que esta estrutura cerebral e seus moduladores estão presentes, mesmo que de uma forma simplificada, e que são relevantes para as espécies há muito tempo na árvore da vida.

Analisando o cérebro de ratos Wistar neonatos (1-2 dias), adultos (aproximadamente 90 dias) e envelhecidos (aproximadamente 180 dias), observa-se que o hipotálamo apresenta um tamanho considerável desde os animais recém-nascidos. Ademais, esta estrutura cerebral foi pesada e foram obtidos os seguintes resultados: animais neonatos, aproximadamente 20 mg; animais adultos, aproximadamente 50 mg; e animais envelhecidos, aproximadamente 70 mg. Assim, pode-se inferir que o hipotálamo, por desempenhar importantes funções desde o princípio da vida dos indivíduos, como a manutenção do metabolismo, a regulação do ciclo-circadiano, a produção e o controle da secreção de hormônios, entre outros, tem desde o início do desenvolvimento um tamanho considerável e que esta tendência é mantida ao longo da vida, pois esta estrutura posteriormente também está relacionada com a maturação sexual e a reprodução. Portanto, o hipotálamo acompanha as mudanças ao longo da vida dos indivíduos e melhor compreender esta região cerebral é fundamental para se entender as alterações metabólicas relacionadas ao envelhecimento.

O envelhecimento é um processo resultante do acúmulo de danos genéticos, celulares e moleculares, e diversos fatores foram identificados como sendo a causa ou consequência do declínio relacionado com a idade nas funções e mecanismos de reparo de tais danos (Vijg & Campisi, 2008; Wilson et al., 2008; Gems & Partridge, 2013). O hipotálamo é tanto a fonte quanto um alvo de muitos fatores e de hormônios responsáveis pela homeostase corporal. Com o avanço da

idade, a sensibilidade do hipotálamo a vários sinais de *feedback* começa a diminuir, podendo acarretar em disfunções que possuem a capacidade de contribuir para o desenvolvimento de doenças como a depressão, déficits cognitivos, Alzheimer, entre outras e, além da disfunção neuro-cognitiva, também tem sido associado a este processo o declínio do desempenho físico e a sarcopenia (Gupta & Morley, 2014).

Uma das consequências do envelhecimento cerebral, a inflamação hipotalâmica pode causar mudanças metabólicas que são capazes de levar a modificações na homeostase energética que resultam, por exemplo, em intolerância à glicose, resistência à leptina e, também, no aumento da massa corporal (Kmiec, 2010; Thaler et al., 2013; Jais & Brüning, 2017). A obesidade, e as complicações associadas a esta condição, causam forte impacto à nossa sociedade. Apesar deste conhecimento, ainda sabemos pouco acerca dos mecanismos celulares e moleculares hipotalâmicos que envolvem a obesidade. Diversos trabalhos têm focado no controle neuronal da homeostase energética, mas só recentemente outro elemento importante vem sendo estudado: a glia (Yang, 2015).

Assim, é fundamental considerar as funções exercidas pelas células gliais, principalmente os astrócitos, tanto no envelhecimento quanto no controle do metabolismo energético, para melhor compreender possíveis alterações na funcionalidade dessas células a fim de desenvolver novas terapias eficazes para as condições previamente citadas.

Nesse contexto, a cultura de astrócitos de animais adultos e envelhecidos representa uma importante nova ferramenta para a investigação do papel deste tipo celular no envelhecimento cerebral. Muitos estudos empregam culturas de células provenientes de animais neonatos com esta intenção, todavia a utilização de tecidos provenientes de animais adultos e/ou envelhecidos pode ser mais fidedigna, já que eles apresentam conexões mais estabelecidas e menor plasticidade (Lange et al., 2012; Souza et al., 2013). Cabe ressaltar que os animais utilizados neste trabalho foram alimentados com dieta balanceada (regular) ao longo de suas vidas até o momento de serem realizadas as culturas.

Com o intuito de assegurar que as culturas de astrócitos hipotalâmicos, obtidas através do protocolo descrito neste trabalho, possam ser utilizadas como modelo para estudos da funcionalidade dos astrócitos durante o processo de envelhecimento, inicialmente foi realizada a caracterização morfológica e a identificação de marcadores clássicos nas culturas de animais de diferentes idades: neonatos, adultos e envelhecidos. Através de microscopia de contraste de fase, observamos a morfologia clássica desse tipo celular em cultura para todas as idades. A proteína do citoesqueleto actina apresentou intensa marcação, e ela é considerada a principal responsável pela morfologia celular e também está envolvida na motilidade, migração e adesão celular. Ademais, foram observadas as fibras de estresse arranjadas paralelamente em culturas de todas as idades estudadas, uma característica tradicional do citoesqueleto formado por esta proteína (Perez et al., 2005). A expressão das proteínas do citoesqueleto GFAP e vimentina está relacionada com a manutenção da citoarquitetura, da estabilidade mecânica e das funções sinápticas (Menet et al., 2001). A análise por imunofluorescência indicou que os astrócitos hipotalâmicos em cultura, independente da idade, apresentaram intensa marcação citoplasmática para GFAP e vimentina, o que está de acordo com outros trabalhos que mostram que em cultura primária de astrócitos há a coexpressão destas proteínas (Petruša et al., 2007; Souza et al., 2013). Por fim, a ausência ou baixa marcação para proteínas específicas de neurônios e microglia (dados não mostrados), atestou o caráter astrocítico das culturas.

Neste trabalho, foi realizada também a caracterização do perfil de diferentes aminoácidos no meio extracelular das culturas de astrócitos hipotalâmicos de diferentes idades, e foi verificado que o perfil é bastante variado, sendo que os astrócitos os utilizaram de diferentes formas durante a idade adulta e o envelhecimento. As células de animais neonatos apresentaram uma utilização preferencial de glutamato e de aspartato, observando-se grande diminuição nos níveis extracelulares destes aminoácidos, de 70% e 80%, respectivamente. Por outro lado, os astrócitos adultos e envelhecidos mostraram uma utilização mais variável, observando-se níveis reduzidos de vários aminoácidos no meio extracelular, incluindo glutamina, aspartato, serina, valina, isoleucina e leucina, além de metionina e lisina, nas culturas de animais envelhecidos. Além disso, a

concentração extracelular da alanina aumentou em todas as idades, de uma forma idade-dependente. No SNC, os aminoácidos não são utilizados somente para a síntese proteica, mas também são uma parte essencial do metabolismo e da sinalização celular (Parpura & Verkhratsky, 2013).

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório com diversas funções fisiológicas e, no hipotálamo, ele tem sido associado ao controle do comportamento alimentar e da regulação neuroendócrina, porém níveis elevados deste aminoácido na fenda sináptica podem causar efeitos indesejáveis e prejudiciais ao cérebro, tais como disfunções e degeneração neuronais, podendo levar a distúrbios como esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Parkinson, esquizofrenia, entre outros (Meister, 2007; Lau & Tymianski, 2010; Kostic et al., 2013; Plitman et al., 2014). Para a retirada deste aminoácido da fenda sináptica, a fim de proteger o SNC de possíveis efeitos deletérios de seu acúmulo, os astrócitos realizam a sua captação através de transportadores de glutamato de alta afinidade (Murphy-Royal et al., 2017). Com relação à captação deste neurotransmissor, foi observado neste trabalho que culturas de animais neonatos captam mais glutamato que as culturas de animais adultos e envelhecidos. Todavia, os níveis tanto de GLAST quanto de GLT-1, os principais transportadores de glutamato presente nos astrócitos, não tiveram suas expressões alteradas com relação à idade. Também foi avaliada a concentração de glutamato extracelular, e nas culturas de animais neonatos houve uma diminuição significativa de seus níveis em comparação com o meio de cultura utilizado para a incubação das células, indicando um possível consumo deste aminoácido pelos astrócitos dessa idade. O cérebro apresenta uma alta demanda energética para o seu funcionamento e, por isso, podemos supor que a maior captação de glutamato e a diminuição nos níveis extracelulares deste aminoácido nas culturas de animais neonatos estão relacionadas com a sua utilização para a síntese proteica e/ou como substrato energético pelas células (Miccheli et al., 2003; Yin et al., 2016). Porém, quando foram analisadas as culturas de animais adultos e envelhecidos, percebeu-se que ocorreu uma liberação de glutamato para o meio extracelular, a qual pode estar envolvida com o papel de sinalização desempenhado pelos astrócitos, através da gliotransmissão glutamatérgica (Jourdain et al., 2007; Yang et al., 2011).

Após ser captado pelos astrócitos, o glutamato pode entrar no ciclo glutamato-glutamina através da GS, uma enzima marcadora de astrócitos, responsável pela conversão de glutamato em glutamina (Parpura & Verkhratsky, 2012). Este tipo celular é fundamental na manutenção da homeostasia glutamatérgica, e uma diminuição na atividade da GS tem sido relatada em transtornos neuropsiquiátricos nos quais a excitotoxicidade glutamatérgica desempenha um importante papel (Sheldon & Robinson, 2007). Neste estudo, foi observado que, em concordância com o declínio na captação de glutamato, a atividade de GS estava diminuída em astrócitos adultos e envelhecidos, implicando em uma possível alteração relacionada à idade no ciclo glutamato-glutamina hipotalâmico, que pode modificar a transmissão glutamatérgica e as respostas neuroendócrinas.

Outro possível destino para o glutamato é sua união com a cisteína e a glicina, através da enzima GCL, com a finalidade de sintetizar um importante antioxidante do SNC, a GSH. O cérebro possui um grande potencial oxidativo, pois é um tecido que consome quantidades significativas de oxigênio e, portanto, constantemente estão sendo produzidas espécies reativas de oxigênio. Todavia, existe um equilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e antioxidantes em condições consideradas normais (Halliwell, 2007). Quando ocorre um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio não acompanhado por um aumento nos níveis de moléculas antioxidantes – o que é comum durante o envelhecimento cerebral – temos a presença do estresse oxidativo, que pode acarretar danos ao DNA, lipídeos e proteínas (Calabrese et al., 2004). Além disso, existem evidências de que o estresse oxidativo ao longo do envelhecimento tem relação com condições neurodegenerativas como, por exemplo, comprometimento cognitivo leve, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington (Mariani et al., 2005). Quanto à atividade da GCL e os níveis de GSH, observamos o mesmo perfil de diminuição significativa na cultura de animais adultos, porém ocorrendo uma recuperação tanto na atividade da GCL quanto no conteúdo de GSH nos animais envelhecidos. Como o hipotálamo é responsável por diversas funções essenciais à sobrevivência dos indivíduos e, conseqüentemente das espécies, esta região cerebral ao apresentar uma recuperação dos níveis de GSH em animais

envelhecidos demonstra sua capacidade de resistir a alterações e, também, mostra a plasticidade do hipotálamo inclusive em idade avançada, estando de acordo com outro estudo que demonstrou que as defesas antioxidantes nos astrócitos mudam ao longo da vida (Liddell et al., 2010).

Os astrócitos, além de estarem envolvidos com o metabolismo glutamatérgico, também estão intimamente relacionados ao metabolismo da glicose, e atuam como sensores desse substrato energético no hipotálamo. Os astrócitos captam a glicose através dos GLUTs e, após ser fosforilada em glicose-6-fosfato, pode ser processada por diferentes vias metabólicas, principalmente a glicólise, levando à produção de lactato, que é liberado para o meio extracelular (Wang & Bordey, 2008; Bélanger et al., 2011). No presente trabalho, verificamos que a captação da glicose não se alterou nas culturas de nenhuma das idades estudadas. No entanto, os níveis de lactato no meio extracelular aumentaram nas culturas de idade adulta em relação às culturas de neonatos, e uma posterior diminuição na liberação desse metabólito ocorreu nas células envelhecidas, tanto em comparação com as culturas de adultos quanto de neonatos. Diversos estudos apontam o lactato, produzido e liberado pelos astrócitos, como uma importante fonte energética para os neurônios (Caesar et al., 2008; Zielke et al., 2009). Além de ser um substrato energético, o lactato tem a capacidade de ativar neurônios sensíveis à glicose, e a sua infusão central causa uma diminuição nos níveis de glicose circulante através de mudanças na sinalização de neurônios eferentes que controlam a produção de glicose hepática. A infusão de lactato também pode causar o controle da secreção de insulina, sendo assim, através destes mecanismos, capaz de regular a ingestão alimentar (Leloup et al., 2016). Assim, as diferenças metabólicas observadas nos astrócitos hipotalâmicos entre as idades estudadas, principalmente com relação à idade adulta, podem ser críticas no controle da homeostase energética por esta região cerebral, inclusive porque justamente nessa fase da vida é que algumas desordens metabólicas, como a obesidade, começam a se desenvolver.

Apesar de diversos estudos descreverem alterações estruturais e funcionais das células durante o envelhecimento cerebral, os mecanismos envolvidos neste processo ainda necessitam ser melhor esclarecidos (Lanni et al., 2010). É sabido

que, com o passar do tempo, há uma menor plasticidade sináptica e que os fatores tróficos são essenciais para a manutenção desta plasticidade. Inclusive, diversos estudos utilizam mediadores tróficos na tentativa de desenvolver tratamentos para patologias envolvidas com o envelhecimento cerebral (Patel & Gill, 2007; Weissmiller & Wu, 2012). Os astrócitos têm a capacidade de sintetizar e de secretar alguns fatores fundamentais à sobrevivência, maturação e proliferação neuronais tais como: BDNF, GDNF, TGF- $\beta$  e S100B (Villegas et al., 2003; Skaper, 2012; Villarreal et al., 2014). Neste trabalho, verificamos uma redução idade-dependente nos níveis de BDNF e de GDNF e, contrastantemente, um aumento idade-dependente dos níveis de TGF- $\beta$  e de S100B, o que está de acordo com outro estudo do nosso grupo em astrócitos hipocámpais (Bellaver et al., 2015). O BDNF é um fator fundamental para a sobrevivência tanto de neurônios quanto de oligodendrócitos, além de participar do processo de plasticidade sináptica, e a diminuição dos seus níveis tem envolvimento com a desmielinização neuronal, podendo levar a patologias (Fulmer et al., 2014). No hipotálamo, o BDNF realiza uma importante conexão entre a plasticidade e a regulação do comportamento alimentar, sendo que camundongos deficientes em BDNF são obesos, mostrando a importância deste fator trófico na manutenção do metabolismo (Gray et al., 2006; Cordeira & Rios, 2011). Com relação ao GDNF, níveis reduzidos deste mediador podem deixar os neurônios e a glia mais propensos a insultos oxidativos e/ou inflamatórios (Lin & Tseng, 2015), sendo que a transferência de seu gene no hipotálamo induz perda de peso tanto em animais jovens quanto em adultos (Tümer, et al., 2006). A proteína S100B e o TGF- $\beta$  apresentam papéis tanto neurotróficos quanto neurotóxicos às células do SNC, dependendo de suas concentrações. Quando presente em altos níveis, tanto a S100B quanto o TGF- $\beta$  parecem participar da resposta imune e, portanto, o aumento destes elementos observado neste estudo pode estar envolvido com condições relacionadas ao envelhecimento cerebral, como a inflamação (Teeling & Perry, 2009; Villarreal et al., 2014). No hipotálamo, os níveis de TGF- $\beta$  estão aumentados em indivíduos obesos e ao longo do envelhecimento (Yan et al., 2014), enquanto um aumento na S100B nesta região cerebral é visto em resposta a hiperfagia (Buckman et al., 2015). De uma maneira geral, essa alteração idade-dependente na liberação de importantes fatores tróficos por astrócitos hipotalâmicos pode influenciar na

modulação dos circuitos neurais nessa região cerebral, afetando suas funções no controle metabólico (Chowen et al., 2016).

O estresse oxidativo e a resposta inflamatória são características do processo de envelhecimento cerebral, podendo causar alterações prejudiciais a este órgão. Portanto, é essencial que certas vias envolvidas com efeitos citoprotetores estejam funcionando adequadamente, incluindo a sinalização promovida pelo fator de transcrição Nrf-2. Esta via exerce seu papel benéfico por ser capaz de regular genes relacionados às funções antioxidante e anti-inflamatória (Wakabayashi et al., 2010; Yamazaki et al., 2015). Entre os alvos do Nrf-2 estão os genes que codificam as enzimas GCL e HO-1, sendo que o aumento na expressão desta última é fundamental para a ativação dos mecanismos de defesa das células astrogliais frente a situações pró-oxidantes e inflamatórias (Baird & Dinkova-Kostova, 2011; Quincozes-Santos et al., 2014; Bellaver et al., 2016a; Souza et al., 2016). A HO-1 catalisa a degradação do grupamento heme em monóxido de carbono e nos antioxidantes biliverdina e bilirrubina. Estudos indicam o papel dessa enzima na homeostase celular e, também, como um sensor de estresse celular, uma vez que seus produtos participam dinamicamente na adaptação celular (Dunn et al., 2014; Motterlini & Foresti, 2014). Em astrócitos, a atividade da HO-1 tem sido relacionada ao mecanismo pelo qual moléculas, como o resveratrol e a guanosina exercem suas funções glioprotetoras, reforçando a importância de se manter a ativação da via Nrf-2/HO-1 durante o processo de envelhecimento para limitar ou prevenir danos celulares (Bellaver et al., 2015; Souza et al., 2016). No presente estudo foi observado o mesmo padrão de queda na expressão gênica, nas culturas de animais adultos, com um posterior retorno aos níveis basais nas culturas de envelhecidos, tanto para Nrf-2 quanto para HO-1. Assim, a variabilidade encontrada na atividade da GCL nas diferentes idades pode estar relacionada com uma diminuição na expressão desta enzima, como consequência de uma deficiência na sinalização do Nrf-2.

Com relação à PI3K, outra via essencial para o controle do metabolismo, do crescimento, da proliferação, da sobrevivência e da migração celular, foi visto que ocorreu uma significativa diminuição idade-dependente com relação à sua

expressão gênica e, também, de outro elemento desta via, a Akt. Assim sendo, a via de sinalização PI3K/Akt, que é reconhecida pelo seu papel no crescimento e na inibição da morte celular, estaria com seu funcionamento desregulado e, alterações no seu funcionamento normal estão relacionadas, por exemplo, ao estado inflamatório e a doenças metabólicas (Cantley, 2002; Wymann et al., 2003).

O aumento da resposta inflamatória é uma condição presente ao longo do envelhecimento cerebral e, também, em diferentes eventos neuropatológicos, resultante da ativação da microglia e dos astrócitos (Farina, 2007). Estas células possuem um papel fundamental na resposta inflamatória no SNC, inclusive no hipotálamo, através da síntese de uma série de citocinas, quimiocinas e outros mediadores (Jiang & Cadenas, 2014). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são os primeiros mediadores a serem secretados e sinalizam para que haja, em seguida, a produção e secreção da IL-6, sendo que a expressão desta última também é afetada pela presença da proteína S100B (Hamby & Sofronew, 2010). Além destes, temos a presença da IL-18 e da quimiocina MCP-1, importantes mediadoras envolvidas no processo pró-inflamatório e que estão associadas ao envelhecimento e a doenças neurológicas (Ramesh et al., 2013).

Sobre a IL-10, ela tem a capacidade de diminuir a expressão do TNF- $\alpha$  e de causar um atraso na ativação do NF $\kappa$ B, resultando em um efeito anti-inflamatório (Tukhovskaya et al., 2014). O presente estudo observou uma diminuição idade-dependente, indicando que esta interleucina tem uma menor capacidade de proteger o hipotálamo de injúrias resultantes do processo inflamatório.

Um fator importante neste evento é o NF $\kappa$ B, que rege a transcrição de genes que codificam citocinas, quimiocinas e enzimas pró-inflamatórias (Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2009). Esse fator de transcrição pode ser ativado por diversas vias de sinalização, incluindo membros da família MAPK, como a p38 (Kaminska et al., 2009). Foi observado um aumento idade-dependente nas culturas de astrócitos hipotalâmicos da expressão gênica e níveis nucleares de p65 NF $\kappa$ B, bem como um aumento nos níveis de p38, indicando que estes elementos podem estar envolvidos no processo inflamatório relacionado com o envelhecimento. Assim, o aumento

significativo nos níveis dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 e MCP-1 está de acordo com o aumento idade-dependente de p38/NF $\kappa$ B.

O mesmo perfil de aumento idade-dependente foi averiguado com relação à COX-2, uma enzima pró-inflamatória envolvida na síntese de prostaglandinas, que apresenta um rápido aumento na sua expressão em resposta a citocinas e a moléculas pró-inflamatórias, e que tem relação com doenças neurodegenerativas (Minghetti, 2004).

Sobre a iNOS, outra enzima avaliada neste trabalho, foi verificado um aumento na idade adulta e uma posterior diminuição no envelhecimento. Porém, apesar disso, a expressão da iNOS nas culturas envelhecidas foi significativamente maior em relação às culturas de neonatos. Esta enzima sintetiza NO que, por sua vez, é capaz de atuar como um ativador da resposta inflamatória. Outro ponto a ser ressaltado é a relação entre o Nrf-2 e a HO-1, pois o primeiro controla a expressão do último e, por fim, os produtos da HO-1 inibem a iNOS (Wakabayashi et al., 2010). Além disso, o Nrf-2 diminui a ativação do NF $\kappa$ B e, embora nas culturas de animais envelhecidos a expressão do Nrf-2 tenha sido maior do que nas culturas de adultos, a ativação do NF $\kappa$ B se mostrou aumentada, indicando um predomínio da sinalização pró-inflamatória durante o envelhecimento.

Os astrócitos também expressam receptores para hormônios envolvidos na homeostase metabólica/energética, incluindo a leptina (Hsuchou et al., 2009). Este tipo celular pode regular alguns dos efeitos metabólicos relacionados a este hormônio no hipotálamo, como demonstrado em um estudo no qual a deleção dos LepR astrocitários levou a uma diminuição da inibição da ingestão alimentar (Kim et al., 2014). Além disso, a resistência à leptina tem sido associada ao envelhecimento, e envolve vários mecanismos (Gabriely et al., 2002; Wauman & Tavernier, 2011). Existem pelo menos seis isoformas de LepR, nas quais os domínios citoplasmáticos diferem em sua extensão, como por exemplo a isoforma curta LepRa e a isoforma longa LepRb, ambas encontradas nos astrócitos (Hsuchou et al., 2009; Chowen et al., 2016). A isoforma LepRb é a principal responsável pelos efeitos da leptina no SNC, como o controle da ingestão alimentar, e está associada a diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a PI3K/Akt (Alisson & Myers, 2014). Neste

trabalho, foi observada uma diminuição idade-dependente na expressão de LepRb em culturas de astrócitos hipotalâmicos, assim como uma diminuição na expressão gênica da PI3K e da Akt, sugerindo uma possível alteração na resposta dos astrócitos hipotalâmicos à leptina ao longo do processo de envelhecimento. Além disso, em astrócitos hipotalâmicos, a leptina tem a capacidade de modificar a expressão tanto da GFAP quanto da vimentina, dependendo da sua concentração e do tempo de exposição, podendo, assim, alterar as funções desempenhadas pelo citoesqueleto nessas células (García-Cáceres et al., 2011; Fuente-Martin et al., 2012).

Ademais, foi avaliado o efeito da exposição à leptina na resposta inflamatória, já que efeitos pró-inflamatórios deste hormônio foram descritos previamente (Pinteaux et al., 2007; Hsueh et al., 2009). Nas culturas de astrócitos adultos e envelhecidos, a leptina causou um aumento na liberação tanto de TNF- $\alpha$  quanto de IL-1 $\beta$ , porém não alterou os níveis extracelulares da IL-10. Assim, apesar da diminuição da expressão de LepRb, as células foram capazes de responder ao estímulo da leptina. Embora os mecanismos relativos a esse efeito precisem ser melhor elucidados, podem envolver outros tipos de LepR como, por exemplo, a isoforma LepRa, uma vez que estudos demonstraram sua associação com os efeitos pró-inflamatórios da leptina (Koga et al., 2014).

Em suma, este trabalho mostrou que o modelo de cultura primária de astrócitos hipotalâmicos de ratos adultos e envelhecidos apresentado é uma ferramenta apropriada ao estudo de propriedades celulares, moleculares e bioquímicas relacionadas ao processo de envelhecimento. Foram descritas alterações astrocitárias, muitas delas idade-dependentes, com relação ao perfil de aminoácidos, ao metabolismo glutamatérgico, à produção e liberação de lactato, à síntese e à secreção de fatores tróficos, à resposta inflamatória, às vias de sinalização possivelmente envolvidas em diversas das funções citadas, e o efeito da leptina na resposta inflamatória. Tais alterações averiguadas neste estudo podem ser críticas para o correto funcionamento do hipotálamo durante o envelhecimento e podem estar relacionadas com o desenvolvimento de desordens metabólicas ao longo da vida. Por fim, este estudo demonstra que as células astrocitárias podem ser

um importante alvo para se elucidar tanto a fisiologia do envelhecimento cerebral quanto as situações patológicas advindas das desordens no funcionamento normal destas células na região hipotalâmica.

## CONCLUSÕES

- As culturas de astrócitos hipotalâmicos obtidas a partir de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e envelhecidos apresentam características morfológicas e a expressão de marcadores clássicos de astrócitos, representando uma importante ferramenta para estudo da funcionalidade astrocitária no envelhecimento;
- Os astrócitos hipotalâmicos apresentam alterações em suas propriedades funcionais dependentes da idade, incluindo a regulação da homeostase glutamatérgica, biossíntese de GSH, metabolismo de aminoácidos e de glicose, suporte trófico, resposta inflamatória e sensibilidade à leptina;
- Alterações nas vias de sinalização Nrf-2/HO-1, p38 MAPK, NFκB, COX-2, iNOS e PI3K/Akt são potenciais mecanismos envolvidos nas mudanças da funcionalidade astrocitária observadas;
- Em suma, este trabalho demonstra que os astrócitos são relevantes para o estudo tanto da fisiologia do envelhecimento cerebral quanto de situações patológicas decorrentes de alterações no funcionamento normal destas células no hipotálamo.

## PERSPECTIVAS

- Verificar as respostas astrocitárias em culturas preparadas a partir de animais alimentados com diferentes dietas ao longo do envelhecimento;
- Analisar os papéis de vias de sinalização associadas ao metabolismo e envelhecimento como a GSK3 $\beta$  e a SIRT1 em parâmetros astrocitários;
- Avaliar o efeito da administração de resveratrol tanto *in vitro* quanto *in vivo* em animais de diferentes idades expostos a dietas variadas;
- Verificar o papel da enzima HO1 sobre os efeitos protetores do resveratrol.

## REFERÊNCIAS

- Allen N.J. and Barres B.A. (2009) Neuroscience: glia—more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677.
- Argente-Arizón P., Freire-Regatillo A., Argente J., Chowen J.A. (2015) Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front. Endocrinol.* 6, 42.
- Arús B.A., Souza D.G., Bellaver B., Souza D.O., Gonçalves C.A., Quincozes-Santos A., Bobermin L.D. (2017) Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Mol. Cell Biochem.*
- Baird L., Dinkova-Kostova A.T. (2011) The cytoprotective role of the Keap1-Nrf-2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85, 241–272.
- Barres B.A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–40.
- Bass V., Gordon C.J., Jarema K.A., MacPhail R.C., Cascio W.E., Phillips P.M., et al. (2013) Ozone induces glucose intolerance and systemic metabolic effects in young and aged Brown Norway rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273:551–560.
- Bélangier M., Allaman I., Magistretti P.J. (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724e738.
- Bellaver B., Souza D.G., Bobermin L.D., Souza D.O., Gonçalves C.-A., Quincozes-Santos A. (2015) Resveratrol protects hippocampal astrocytes against LPS-induced neurotoxicity through HO-1, p38 and ERK pathways. *Neurochemical Research.* 40(8):1600–1608.
- Bellaver B. (a), Bobermin L.D., Souza D.G., Rodrigues M.D., de Assis A.M., Wajner M., Gonçalves C.A., Souza D.O., Quincozes-Santos A. (2016) Signaling mechanisms underlying the glioprotective effects of resveratrol against mitochondrial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1862(9):1827-38.

- Bellaver B. (b), Souza D.G., Souza D.O., Quincozes-Santos A. (2016) Hippocampal astrocyte cultures from adult and aged rats reproduce changes in glial functionality observed in the aging brain. *Mol. Neurobiol.* 1–17.
- Blüher S., Mantzoros C.S. (2009) Leptin in humans: lessons from translational research. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:991S–997S.
- Bobermin L.D., Wartchow K.M., Flores M.P., Leite M.C., Quincozes-Santos A., Goncalves CA. (2015) Ammonia-induced oxidative damage in neurons is prevented by resveratrol and lipoic acid with participation of heme oxygenase 1. *Neurotoxicology.* 49, 28–35.
- Bouzier-Sore A.K. and Pellerin L. (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front. Cell Neurosci.* 7, 179.
- Bramanti V., Tomassoni D., Avitabile M., Amenta F., Avola R. (2010) Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front. Biosci.* 2, 558–570.
- Buckman L.B., Thompson M.M., Lippert R.N., Blackwell T.S., Yull F.E., Ellacott K.L.J. (2015) Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Mol. Metab.* 4, 58–63.
- Budni J., Bellettini-Santos T., Mina F., Garcez M.L., Zugno A.I. (2015) The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and Disease* 6, 331–341.
- Burbridge S., Stewart I., Placzek M. (2016) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *J. Comp. Physiol.* 6, 623-643.
- Caesar K., Hashemi P., Douhou A., et al. (2008) Glutamate receptor-dependent increments in lactate, glucose and oxygen metabolism evoked in rat cerebellum in vivo. *J. Physiology.* 586(5):1337–1349.
- Calabrese V., Boyd-Kimball D., Scapagnini G., Butterfield D.A. (2004) Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo* 18(3):245–268.

- Cantley L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Chen T.T., Maevisky E.I., Uchitel M.L. (2015) Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: the central and peripheral roles of succinate. *Front. Endocrinol.* 2, 6-7.
- Cheunsuang O. and Morris R. (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 52, 228–33.
- Chowen J.A., Argente-Arizón P., Freire-Regatillo A., et al (2016) The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. *Prog. Neurobiol.* 144, 68–87.
- Coll A.P. and Yeo G.S. (2013) The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 970–976.
- Cordeira J., Rios M. (2011) Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. *Mol. Neurobiol.* 44, 441–448.
- Cornejo M.P., Hentges S.T., Maliqueo M., Coirini H., Becu-Villalobos D., Elias C.F. (2016) Neuroendocrine regulation of metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 28(7).
- Christensen K., Doblhammer G., Rau R., Vaupel J.W. (2009) Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet* 374, 1196–1208.
- Cuadrado A., Rojo A.I. (2008) Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections. *Curr. Pharm. Des.* 14(5):429–442.
- Danbolt N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65,1–105.
- Davis J.D., Wirtshafter D., Asin K.E., Brief D. (1981) Sustained intracerebroventricular infusion of brain fuels reduces body weight and food intake in rats. *Science* 212, 81–83.

De Pittà M., Brunel N., Volterra A. (2016) Astrocytes: orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience* 323, 43-61.

De Pittà M. and Brunel N. (2016) Modulation of Synaptic Plasticity by Glutamatergic Gliotransmission: A Modeling Study. *Neural Plast.* 2016:7607924.

Donato R., Sorci G., Riuzzi F., Arcuri C., Bianchi R., Brozzi F., Tubaro C., Giambanco I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022.

Donato J.J., Frazao R., Elias C.F. (2010) The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 54, 591–602.

Donato R., Cannon B.R., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., Weber D.J., et al. (2013) Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 13(1):24–57.

Dowell J.A., Johnson J.A. (2013) Mechanisms of Nrf-2 protection in astrocytes as identified by quantitative proteomics and siRNA screening. *PLoS One* 8:e70163.

Dringen R., Brandmann M., Hohnholt M.C., Blumrich E.M. (2014) Glutathione-dependent detoxification processes in astrocytes. *Neurochem. Res.* 40(12):2570–2582.

Dunn L.L., Midwinter R.G., Ni J., Hamid H.A., Parish C.R., Stocker R. (2014) New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1723–1742.

Eisenberg D., Gill H.S., Pfluegl G.M., Rotstein S.H. (2000) Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 122–145.

Farina C., Aloisi F., Meinl E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28(3):138–145.

Farrand A.Q., Gregory R.A., Scofield M.D., Helke K.L., Boger H.A. (2015) Effects of aging on glutamate neurotransmission in the substantia nigra of Gdnf heterozygous mice. *Neurobiol. Aging* 36(3):1569-76.

- Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolaños J.P. (2012) Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem. J.* 443(1):3–11.
- Flak J.N. and Myers Jr M.G. (2016) Minireview: CNS mechanisms of leptin action. *Mol. Endocrinol.* 30(1), 3–12.
- Fuente-Martin E., Garcia-Caceres C., Granado M., De Ceballos M.L., SanchezGarrido M.A., Sarman B., et al. (2012) Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J. Clin. Invest.* 122, 3900–13.
- Fulmer C.G., VonDran M.W., Stillman A.A., Huang Y., Hempstead B.L., Dreyfus C.F. (2014) Astrocyte-derived bdnf supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J. Neurosci.* 34, 8186–8196.
- Gabriely I., Ma X.H., Yang X.M., Rossetti L., Barzilai N. (2002) Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes* 51, 1016–1021.
- Gao Z., Zhu Q., Zhang Y., et al. (2013) Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.* 48(3):690–701.
- García-Cáceres C., Fuente-Martin E., Burgos-Ramos E., Granado M., Frago L.M., Barrios V., et al. (2011) Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152, 1809–18.
- García-Cáceres C., Yi CX, Tschop MH. (2013) Hypothalamic astrocytes in obesity. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 42(1):57–66.
- Gems D. and Partridge L. (2013) Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol.* 75, 6216–44.
- Ghasemi M. and Fatemi A. (2014) Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 45, 168–182.
- Gonzalez-Perez O., Lopez-Virgen V., Quinones-Hinojosa A. (2015) Astrocytes: everything but the glue. *Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2, 115–117.

Gray J., Yeo G.S.H., Cox J.J., Morton J., Adlam A.-L.R., Keogh J.M., Yanovski J.A., El Gharbawy A., Han J.C., Tung Y.C.L., Hodges J.R., Raymond F.L., O'rahilly S., Farooqi I.S., (2006) Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55, 3366–3371.

Gupta D. and Morley J.E. (2014) Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Compr. Physiol.* 4, 1495–1510.

Hamby M.E. and Sofroniew M.V. (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7, 494–506.

Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147-1150.

Hauwel M., Furon E., Canova C., Griffiths M., Neal J., Gasque P. (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res. Rev.* 48,220–33.

Hertz L., Dringen R., Schousboe A., Robinson S.R. (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 57, 417–428.

Hertz L. and Zielke H.R. (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 27(12):735–743.

Hsuchou H., Pan W., Barnes M.J., Kastin A.J. (2009) Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* 30, 2275-2280.

Jais A. and Brüning J.C. (2017) Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 127(1):24-32.

Jensen C.J., Massie A., De Keyser J. (2013) Immune players in the CNS: the astrocyte. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8,824–839.

Jha M.K. and Suk K. (2013) Glia-based biomarkers and their functional role in the CNS. *Expert Rev. Proteomics* 10, 43–63.

- Jiang T. and Cadenas E. (2014) Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell* 13(6):1059–1067.
- Jourdain P., Bergersen L.H., Bhaukaurally K., Bezzi, P., Santello M., Domercq M., Matute C., Tonello F., Gundersen V., Volterra A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331–339.
- Kaltschmidt B. and Kaltschmidt C. (2009) NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 1(3):a001271.
- Kaminska B., Gozdz A., Zawadzka M., Ellert-Miklaszewska A., Lipko M. (2009) MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat. Rec.* 292, 1902–1913.
- Kelly M.J. and Rønnekleiv O.K. (2015) Minireview: neural signaling of estradiol in the hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 29, 645–657.
- Kim J.G., Suyama S., Koch M., et al. (2014) Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908–910.
- Kirkwood T.B. (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437–447.
- Kettenmann H. and Verkhratsky A. (2008) Neuroglia: The 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–659.
- Kmiec Z. (2010) Central control of food intake in aging. *Interdiscip. Top. Gerontol.* 37, 37–50.
- Koga S., Kojima A., Ishikawa C., Kuwabara S., Arai K., Yoshiyama Y. (2014) Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression. *Neurobiol. Dis.* 71, 180–192.
- Kostic M, Zivkovic N, Stojanovic I. (2013) Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev. Neurosci.* 24, 71-88.
- Kriegelstein K., Strelau J., Schober A., Sullivan A., Unsicker K. (2002) TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris.* 96(1–2):25–30.

- Lange S.C., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Schousboe A., Norenberg M.D. (2012) Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem. Res.* 37, 2569–2588.
- Lanni C., Stanga S., Racchi M., Govoni S. (2010) The expanding universe of neurotrophic factors: therapeutic potential in aging and age-associated disorders. *Curr. Pharm. Des.* 16, 698–717.
- Lau A. and Tymianski M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* 460(2):525–542.
- Leloup C., Allard C., Carneiro L., Fioramonti X., Collins S., Pénicaud L. (2016) Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? *Neuroscience* 323, 110–120.
- Liddell, J.R., Robinson, S.R., Dringen, R., Bishop, G.M. (2010) Astrocytes retain their antioxidant capacity into advanced old age. *Glia* 58, 1500–1509.
- Lin P.Y., Tseng P.T. (2015) Decreased glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with depression: a meta-analytic study. *J. Psychiatr. Res.* 63, 20–27.
- Lu S.C. (2013) Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(5):3143–3153.
- Luján R., Shigemoto R., López-Bendito G. (2005). Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130, 567–580.
- Lynch A.M., Murphy K.J., Deighan B.F., O'Reilly J.A., Gun'ko Y.K., Cowley T.R., Gonzalez-Reyes R.E., Lynch M.A. (2010) The impact of glial activation in the aging brain. *Aging Dis.* 1, 262–278.
- Ma X.H., Muzumdar R., Yang X.M., Gabriely I., Berger R., Barzilai N. (2002) Aging is associated with resistance to effects of leptin on fat distribution and insulin action. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 57(6):B225-31.

- Mariani E., Polidori M., Cherubini A., et al. (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B.* 827, 65–75.
- Meister B. (2007) Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92, 263–271.
- Meister B., Herzer S., Silaharoglu A. (2013) MicroRNAs in the Hypothalamus. *Neuroendocrinology* 98(4):243-53.
- Menet V., Gimenez y Ribotta M., Chauvet N., Drian M.J., Lannoy J., Colucci-Guyon E. et al. (2001) Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* 21, 6147–6158.
- Miccheli A., Puccetti C., Capuani G., Di Cocco M.E., Giardino L., Calzà L., Battaglia A., Battistin L., Conti F. (2003) [1-13C]Glucose entry in neuronal and astrocytic intermediary metabolism of aged rats: a study of the effects of nicergoline treatment by 13C NMR spectroscopy. *Brain Res.* 966, 116–125
- Middeldorp J. and Hol E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421–443.
- Migaud M., Batailler M., Segura S., Duittoz A., Franceschini I., Pilon D. (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur. J. Neurosci.* 32(12):2042–2052.
- Minghetti L. (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 901–910.
- Mombach J.C.M., Vendrusculo B., Bugs C.A. (2015) A Model for p38MAPK-Induced Astrocyte Senescence. *PLoS ONE.*
- Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S., Schwartz M.W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.

Motterlini R. and Foresti R. (2014) Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1810–1826.

Murphy-Royal C., Dupuis J., Groc L., Oliet S.H. (2017) Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.*

Niswender K.D., Morton G.J., Stearns W.H., Rhodes C.J., Myers M.G., Schwartz M.W. (2001) Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413, 794–795.

Oeppen J. and Vaupel J.W. (2002) Broken limits to life expectancy. *Science* 296, 1029–1031.

Parpura V. and Verkhratsky A. (2012) Astrocytes revisited: Concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croat. Med. J.* 53(6):518–528.

Parpura V. and Verkhratsky A. (2013) Astroglial amino acid-based transmitter receptors. *Amino Acids* 44, 1151–1158.

Patel N.K., Gill S.S. (2007) GDNF delivery for Parkinson's disease. *Acta Neuroc. Suppl.* 97(Pt 2):135–54.

Perez V., Bouschet T., Fernandez C., Bockaert J., Journot L. (2005) Dynamic reorganization of the astrocyte actin cytoskeleton elicited by cAMP and PACAP: a role for phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 21, 26–32.

Petrusa M., Garcia-Matas S., Rodriguez-Farre E., Sanfeliu C., Cristofol R. (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* 101, 794-805.

Pekny M. (2001) Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res.* 132, 23–30.

Pekny M., Pekna M., Messing A., Steinhäuser, C., Lee, J.M., Parpura V., Hol E.M., Sofroniew M.V., Verkhratsky A. (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 131, 323–345.

- Perea G. and Araque A. (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38, 375–382.
- Pinteaux E., Inoue W., Schmidt L., Molina-Holgado F., Rothwell N.J., Luheshi G.N. (2007) Leptin induces interleukin-1beta release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J. Neurochem.* 102, 826–833.
- Plitman E., Nakajima S., de la Fuente-Sandoval C., et al. (2014) Glutamate-mediated excitotoxicity in schizophrenia: a review. *European Neuropsychopharm.* 24(10):1591–1605.
- Quincozes-Santos A., Bobermin L.D., Souza D.G., Bellaver B., Goncalves C.A., Souza D.O. (2014) Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. *J. Neurochem.* 130, 61-74.
- Ramesh G., Maclean A.G., Philipp M.T. (2013) Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm.* 2013:480739.
- Roh E. and Kim MS. (2016) Brain regulation of energy metabolism. *Endocrinol. Metab.* 31, 519–524.
- Rose C.F., Verkhratsky A., Parpura V. (2013) Astrocyte glutamine synthetase: Pivotal in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1518–1524.
- Rostás I., Tenk J., Mikó A., Füredi N., Soós S., Solymár M., Lengyel A., Székely M., Gaszner B., Feller D., Pétervári E., Balaskó M. (2016) Age-related changes in acute central leptin effects on energy balance are promoted by obesity. *Exp Gerontol.* 1;85:118-127.
- Rothermundt M., Peters M., Prehn J.H., Arolt V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614–632.
- Santello M., Volterra A. (2009) Synaptic modulation by astrocytes via Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release. *Neuroscience* 158(1):253–259.

- Schmidt M.M., Dringen R. (2012) Glutathione (GSH) synthesis and metabolism. *Advances Neurob.* 1029–1050
- Schneeberger M., Gomis R., Claret M. (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* 220, T25–46.
- Sheldon A.L., Robinson M.B. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333e355.
- Shih R.H., Wang C.Y., Yang C.M. (2015) NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 77.
- Skaper S.D. (2012) The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol. Biol.* 846, 1-12.
- Sofroniew M.V. (2014) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 20, 160–172.
- Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A (2013) Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One* 8(3), e60282.
- Souza D.G., Bellaver B., Bobermin L.D., Souza D.O., Quincozes-Santos A. (2016) Anti-aging effects of guanosine in glial cells. *Purinergic Signal.* 12(4):697-706.
- Stobart J.L. and Anderson C.M. (2013) Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 7, article 38
- Takayanagi Y. and Onaka T. (2010) Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J.* 277, 4998–5005.
- Tang Y., Purkayastha S., Cai D. (2015) Hypothalamic microinflammation: A common basis of metabolic syndrome and aging. *Trend. Neurosci.* 38, 36–44.

- Teeling J.L., Perry V.H. (2009) Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: Underlying mechanisms. *Neuroscience* 158, 1062–1073.
- Teschemacher A.G., Gourine A.V., Kasparov S. (2015) A role for astrocytes in sensing the brain microenvironment and neuro-metabolic integration. *Neurochem. Res.* 40, 2386–93.
- Tessmar-Raible K., Raible F., Christodoulou F., Guy K., Rembold M., Hausen H., et al. (2007) Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129, 1389–1400.
- Thaler J.P., Guyenet S.J., Dorfman M.D., Wisse B.E., Schwartz M.W. (2013) Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes* 62, 2629–2634.
- Tümer N., Scarpace P.J., Dogan M.D., Broxson C.S., Matheny M., Yurek D.M., Peden C.S., Burger C., Muzyczka N., Mandel R.J. (2006) Hypothalamic rAAV-mediated GDNF gene delivery ameliorates age-related obesity. *Neurobiol. Aging* 27, 459–470.
- Tukhovskaya E.A., Turovsky E.A., Turovskaya M.V., et al. (2014) Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> response. *Neuroscience Letters* 571, 55–60.
- Twan W.H., Hwang J.S., Lee Y.H., Jeng S.R., Yueh W.S., Tung Y.H., et al. (2006) The presence and ancestral role of gonadotropin-releasing hormone in the reproduction of scleractinian coral, *Euphyllia ancora*. *Endocrinology* 147, 397–406.
- Valdearcos M., Xu A.W., Koliwad S.K. (2015) Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 131–160.
- Vijg J. and Campisi J. (2008) Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454, 1065–1071.
- Villarreal A., Seoane R., González Torres A., Rosciszewski G., Angelo M.F., Rossi A., Barker P.A., Ramos A.J. (2014) S100B protein activates a RAGE-dependent

autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J. Neurochem.* 131(2):190-205.

Villegas S.N., Poletta F.A., Carri N.G. (2003) Glia: a reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol. Int.* 27, 599–609.

Wakabayashi N., Slocum S.L., Skoko J.J., Shin S., Kensler T.W. (2010) When NRF-2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1649–1663.

Wang D. and Bordey A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86(4):342–367.

Waterson M.J. and Horvath T.L. (2015) Neuronal regulation of energy homeostasis: beyond the hypothalamus and feeding. *Cell Metab.* 22, 962-970.

Wauman J. and Tavernier J. (2011) Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 16, 2771–2793.

Weissmiller A.M., Wu C. (2012) Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* 1, 14.

White K.M (2002) Longevity advances in high-income countries. *Pop. Develop. Review* 28(1):59-76

Wilson D.M., Bohr V.A., McKinnon P.J. (2008) DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. *Mech. Ageing Dev.* 129, 349–352.

Wymann M.P., Zvelebil M., Laffargue M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling—which way to target? *Trends Pharmac. Scienc.* 24(7):366–376.

Yamazaki H., Tanji K., Wakabayashi K., Matsuura S., Itoh K. (2015) Role of the Keap1/Nrf-2 pathway in neurodegenerative diseases. *Pathol. Int.* 65, 210–219

Yan J., Zhang H., Yin Y., Li J., Tang Y., Purkayastha S., Li L., Cai D. (2014) Obesity- and aging-induced excess of central transforming growth factor- $\beta$  potentiates diabetic development via an RNA stress response. *Nat. Med.* 20, 1001–1008.

Yang Y. (2015) Astrocytes: targets in obesity. *Oncotarget* 6(15): 12835–12836.

Yang Y., Atasoy D., Su H.H., Sternson S.M. (2011) Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146, 992–1003.

Yin F., Sancheti H., Patil I., Cadenas E. (2016) Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 100, 108–122.

Zielke H.R., Zielke C.L., Baab P.J. (2009) Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *J. Neurochem*. 109, 24–29.