

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

NATHÁLIA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM VU0409551 EM ASTRÓCITOS
DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCO HUMANAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA
ESTIMULADOS COM CITOCINAS RELACIONADAS À ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Belo Horizonte

2022

NATHÁLIA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM VU0409551 EM ASTRÓCITOS
DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCO HUMANAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA
ESTIMULADOS COM CITOCINAS RELACIONADAS À ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Fabíola M. Ribeiro

Belo Horizonte

2022

043

Silva, Nathália Costa.

Avaliação do tratamento com VU0409551 em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com citocinas pró-inflamatórias associadas à Esclerose Múltipla [manuscrito] / Nathália Costa Silva. – 2022.

62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fabíola M. Ribeiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Esclerose Múltipla. 3. Astrócitos. 4. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@cb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATHALIA COSTA SILVA.
 Aos vinte e um dias do mês de julho de 2022 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Teams”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação do tratamento com VU0409551 em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com citocinas pró-inflamatórias associadas à Esclerose Múltipla", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Vinícius de Toledo Ribas (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Allysson Thiago Cramer Soares (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de julho de 2022.

Dr. Vinícius de Toledo Ribas (UFMG)

Dr. Allysson Thiago Cramer Soares (UFMG)

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Virgínia, que sabia rir de seus erros e perseverar até torná-los acertos, e ao Afonso, um grande incentivador dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, que resiste a ataques sistemáticos, contra a pesquisa e a educação, e segue sendo exemplo de ensino público, gratuito e de qualidade, por me proporcionar o acesso ao conhecimento, o contato com pessoas muito importantes para minha jornada e a oportunidade de ampliar minhas capacidades desde a graduação.

Agradeço à professora Fabíola pelo exemplo impecável e pela orientação constante e paciente, agradeço ao Pablo por todo o auxílio e colaboração nesse trabalho. Agradeço à professora Luciene e à Anna Luísa pela ajuda e gentileza na condução dos experimentos e a todos os amigos dos Laboratórios de Neurobioquímica e RNAi pelo enorme auxílio em todos os momentos e inúmeros ensinamentos.

Agradeço à minha amada família, alicerce fundamental da minha existência, que sempre me dá forças apesar da distância, por vezes, cruel que essa jornada nos impõe. Agradeço ao Saulo e sua família pelo carinho e acolhimento que tornam meus dias em BH mais felizes. Agradeço a Esther pela parceria em todos os momentos na bancada e na vida, ao Pedro pelo suporte incondicional e a todos os demais amigos.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neuroinflamatória, autoimune, crônica e incapacitante, em que se desenvolve uma resposta imune auto-reativa voltada para proteínas da bainha de mielina, bem como infiltrado inflamatório no SNC, excitotoxicidade, astrogliose e neurodegeneração. Os astrócitos, que constituem o tipo celular mais abundante no SNC de mamíferos, se tornam reativos mediante injúria. Já foi demonstrado que a ativação do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) é neuroprotetora mediante insulto de glutamato e pode inibir a sinalização microglial pró-inflamatória *in vitro*, bem como induzir a expressão microglial do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em modelo murino da EM. Atualmente, não existem abordagens terapêuticas capazes de tratar de modo simultâneo a neuroinflamação e a neurodegeneração que ocorrem durante a EM. No presente trabalho, buscou-se estabelecer estímulo pró-inflamatório com as citocinas associadas à patologia da EM e à reatividade astrocitária, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e avaliar possível efeito protetor do modulador alostérico positivo (MAP) do mGluR5, o VU0409551, em culturas de astrócitos derivadas de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs) submetidas ao insulto pró-inflamatório. Observamos aumento da expressão de TNF- α e IL-1 β a partir do estímulo com TNF- α e IL-1 β por 24h. Além disso, o VU0409551 induziu aumento da expressão de IL-6, de modo independente do estímulo com TNF- α e IL-1 β . Observou-se também efeito marginal do tratamento com 1 μ M de VU0409551 na prevenção do aumento da expressão de IL-1 β induzida pelo estímulo pró-inflamatório com TNF- α e IL-1 β ao longo de 24h. Os resultados não sugerem alterações na expressão dos demais alvos avaliados, IL-10, GNR, BDNF e EAAT1, e nas concentrações de glutamato dos meios condicionados de astrócitos estimulados com TNF- α , IL-1 β e tratados com VU0409551. Desse modo, o possível potencial anti-inflamatório de VU0409551 não foi confirmado pelos resultados no presente trabalho.

Palavras chave: Esclerose Múltipla, reatividade astrocitária, mGluR5, PAM, VU0409551

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory, autoimmune, chronic and disabling disease that affects the central nervous system due to an autoimmune response against myelin proteins, along with the formation of inflammatory infiltrate, demyelination, excitotoxicity, astrogliosis and neurodegeneration. Astrocytes are the most abundant cell type in the mammalian central nervous system (CNS) and, upon injury, they become reactive. Activation of metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) has been shown to be neuroprotective upon glutamate insult and can inhibit pro-inflammatory microglial signaling *in vitro*, as well as induce microglial and astrocytic BDNF expression in a murine model of MS. Currently, there are no therapeutic approaches that could mitigate both MS-related neuroinflammation and neurodegeneration. In the present study, we aimed to establish a pro-inflammatory stimulus with cytokines associated with MS pathology and astrocytic reactivity, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β) and granulocyte and macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and to evaluate the effect of the positive modulator (PAM) of mGluR5, VU0409551, in stimulated astrocytes derived from human induced pluripotency cells (hiPSCs). We observed an increase in the expression of TNF- α and IL-1 β 24 hours following TNF- α and IL-1 β stimulation. VU0409551 was found to increase the expression of IL-6, regardless of TNF- α and IL-1 β stimulation. Furthermore, a marginal effect of treatment with 1 μ M of VU0409551 was observed in the prevention of the elevation of IL-1 β expression induced by the pro-inflammatory stimulus with TNF- α and IL-1 β over 24h. The results indicate that TNF- α , IL-1 β and VU0409551 treatment does not change the expression of the other evaluated targets IL-10, GNR, BDNF, EAAT1, and does not modify glutamate levels in astrocyte conditioned media. Therefore, the assumed anti-inflammatory effect of VU0409551 was not confirmed by the results in this study.

Keywords: Multiple Sclerosis, reactive astrocytes, mGluR5, PAM, VU0409551

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo ilustrativo das vias de sinalização ativadas pela ligação do glutamato ao mGluR5.

Figura 2. Fórmula estrutural do MAP para mGluR5 VU0409551.

Figura 3. Fórmula estrutural do MAP para mGluR5 VU0360172.

Figura 4. Astrócitos diferenciados a partir de NSCs.

Figura 5. Estímulo pró-inflamatório aumenta os níveis de RNAm para IL-1 β em astrócitos.

Figura 6. Estímulo pró-inflamatório com GM-CSF contribui para aumento dos níveis de RNAm para IL-6 em astrócitos.

Figura 7. Não há variação na expressão relativa de C3 em astrócitos após estímulo pró-inflamatório.

Figura 8. O aumento da expressão de IL-1 β induzido pelo tratamento de astrócitos com TNF- α e IL-1 β não é alterado por VU0409551.

Figura 9. O aumento da expressão de TNF- α induzido pelo tratamento de astrócitos com TNF- α e IL-1 β não é alterado por VU0409551.

Figura 10. Tratamento com VU0409551 induz aumento de IL-6.

Figura 11. Não há variação na expressão relativa de IL-10 em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551.

Figura 12. Não há variação na expressão relativa de BDNF em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551.

Figura 13. Não há variação na expressão relativa de GNR em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551.

Figura 14. Não há variação na expressão relativa de EAAT1 em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551.

Figura 15. Não há variação da liberação de glutamato em meio condicionado de astrócitos após estímulo pró-inflamatório e tratamento com VU0409551.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados referentes à linhagem celular utilizada.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACPD - ácido trans-1S,3R-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico

AKT - proteína quinase B

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA - albumina sérica bovina

CHPG - 2-cloro-5-hidroxifenilglicina

DAG - 1,2-diacilglicerol

DMSO - dimetilsulfóxido

EAAT1 - transportador de aminoácidos excitatórios 1

EAAT2 - transportador de aminoácidos excitatórios 2

EAE - encefalomielite autoimune experimental

EM - Esclerose Múltipla

GDH - glutamato desidrogenase II

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GNR - progranulina

hiPSCs - células tronco humanas de pluripotência induzida

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL-6 - interleucina 6

IL-10 - interleucina 10

IP3 - inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R - receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

IPO8 - importina 8

JNK - c-Jun N-terminal quinase

KRH - tampão Krebs-Ringer-HEPES

MAP - modulador alostérico positivo

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MBP - proteína básica da mielina

MDA - meio de diferenciação de astrócitos

mGluR5 - receptor metabotrópico de glutamato 5

MOG - glicoproteína da mielina de oligodendrócitos

MPEP - 2-metil-6-feniletinil piridina

mTOR - alvo da rapamicina em mamíferos

NEM - meio de expansão neural

NMDA - N-metil-D-aspartato

NSCs - células tronco neurais

P/S - penicilina / estreptomicina

PBS - solução tamponada de fosfato

PIP2- fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PKC - proteína quinase C

PLC β 1- fosfolipase C beta 1

PLP - proteína proteolipídica

RPLP0 - proteína ribossômica ácida 60S P0

SFB - soro fetal bovino

SNC - sistema nervoso central

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Esclerose Múltipla	13
1.2. Manifestações da EM no SNC	14
1.3. Astrócitos na Esclerose Múltipla	16
1.4. Glutamato e neurodegeneração na EM	17
1.5. Sinalização glutamatérgica e moduladores alostéricos para o mGluR5	18
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Cultivo e manutenção de NSCs	24
3.2. Diferenciação das NSCs em astrócitos	24
3.4. Carenciamento das culturas astrocitárias	25
3.6 Transcrição reversa e PCR quantitativa	26
3.7 Ensaio de liberação de glutamato	27
4. ANÁLISE DOS DADOS	28
5. RESULTADOS	29
5.2 Estabelecimento do estímulo pró-inflamatório	30
5.3 Avaliação do tratamento com VU0409551 na expressão de citocinas após estímulo pró-inflamatório em astrócitos	33
5.4 Avaliação do tratamento com VU0409551 na expressão de BDNF e GNR após estímulo pró-inflamatório em astrócitos	38
5.5 Avaliação da expressão de EAAT1 astrocitária e dos níveis de glutamato nos meios condicionados de astrócitos sob insulto pró-inflamatório	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose Múltipla

A principal causa de deficiência neurológica em adultos jovens atualmente é a esclerose múltipla (EM) (Dobson *et al.*, 2019). Trata-se de uma doença crônica, neuroinflamatória, de caráter autoimune que afeta cerca de 2.8 milhões de pessoas em todo o mundo e acomete principalmente as mulheres, que representam 75% dos casos, o que reflete o panorama geral esperado para doenças de origem imunológica (Bishop e Rumrill, 2015; Walton *et al.*, 2020; Duquette *et al.*, 1992). As primeiras manifestações da EM ocorrem durante a vida ativa do indivíduo, entre seus 20 e 50 anos (Bishop e Rumrill, 2015). Ademais, no Brasil, estima-se que a EM gere um custo médio de 33 mil reais por paciente anualmente (Kobelt *et al.*, 2019).

A EM é altamente incapacitante e ao longo de sua progressão, em função do acometimento de diversas regiões do sistema nervoso central (SNC), sintomas extremamente variáveis podem ser desenvolvidos pelos pacientes. É possível que ocorram manifestações visuais, entre elas neurite óptica e diplopia. Também podem ser observados comprometimentos motores e musculares, a exemplo de perda da força muscular, dificuldade de locomoção, espasmos, rigidez e ataxia (Reich *et al.*, 2018). Além disso, relata-se o desenvolvimento de prejuízos cognitivos e mentais, relativos à atenção e memória, bem como alterações de humor, depressão e ansiedade (Ghasemi *et al.*, 2017; Tafti *et al.*, 2022).

A EM apresenta variadas formas de progressão. Aproximadamente 10 a 15% dos casos se manifestam com comprometimentos progressivos a partir do início do desenvolvimento da doença, sendo observada perda contínua de funções, o que caracteriza a forma progressiva-primária da EM (Reich *et al.*, 2018). Contudo, a forma de progressão mais comum, compreendendo cerca de 87% dos casos, é a remitente-recorrente (Ghasemi *et al.*, 2017). Esse subtipo é caracterizado por episódios agudos, denominados surtos, em que há manifestação de novos sintomas, seguidos da ocorrência de períodos de remissão, em que pode haver recuperação total ou parcial da perda de função estabelecida durante o surto (Weiner, 2008). Em 65% dos casos, a forma remitente-recorrente evolui para um período de piora

contínua, caracterizando a forma progressiva-secundária. A forma menos comum é a de recaídas progressivas, em que a partir do início da doença, há piora contínua dos sintomas com eventuais períodos de estabilização (Tullman *et al.*, 2004).

A EM é uma doença multifatorial. São conhecidas aproximadamente 230 variantes de risco genéticas relacionadas à incidência da doença, as quais envolvem, principalmente, genes do complexo principal de histocompatibilidade (Cotsapas e Mitrovic, 2018; Sawcer *et al.*, 2011). Por sua vez, entre os fatores de risco ambientais relacionados ao desenvolvimento da EM encontram-se infecções, a exemplo da causada pelo vírus Epstein–Barr, além de tabagismo, obesidade e deficiência de vitamina D (Ascherio *et al.*, 2013).

Não existe cura para a EM e o tratamento é realizado, majoritariamente, por meio de medicamentos imunossupressores, bem como de anti-inflamatórios, além de drogas para o controle de sintomas isolados (Murray *et al.*, 2006). De modo geral, as intervenções terapêuticas atualmente disponíveis são estratégias de contenção dos danos provocados pela resposta imunológica auto-reativa (Hauser e Cree, 2020). Desse modo, existe um número relevante de abordagens terapêuticas para diminuição da progressão da doença durante os surtos, o que é efetivo enquanto intervenção em relação à forma recorrente-remitente da doença. Entretanto, os tratamentos atuais são incapazes de promover a reversão, parcial ou completa, da deterioração neurológica contínua ou de oferecer mecanismos neuroprotetores (Reich *et al.*, 2018). Portanto, nos estágios progressivos da EM, há um número restrito de abordagens possíveis, uma vez que seria necessário intervir no componente neurodegenerativo, além do neuroinflamatório, que se estabelece durante a patofisiologia da EM (Hauser e Cree, 2020).

1.2. Manifestações da EM no SNC

A EM acomete todo o SNC, tanto o encéfalo quanto a medula espinhal (Filippi e Rocca, 2005). Além disso, formam-se lesões na substância branca, bem como atrofia e neurodegeneração na substância cinzenta (Pirko, *et al.*, 2007).

A patogênese da EM envolve a montagem de uma resposta imunológica auto-reativa. A etiologia dessa resposta imunológica não está bem esclarecida e é postulada por dois modelos distintos. De acordo com a hipótese “de fora para dentro”, a exposição a antígenos ambientais, que mimetizam componentes da bainha de mielina, ativaria células periféricas auto-reativas contra proteínas como a proteína básica da mielina (MBP), glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) e proteína proteolipídica (PLP) (Nociti *et al.*, 2020; Dargahi *et al.*, 2017). Ao chegarem ao SNC, haveria o início do processo neuroinflamatório. Por outro lado, segundo o modelo “de dentro para fora”, componentes da bainha de mielina seriam liberados do SNC para a corrente sanguínea, chegariam ao sistema imunológico periférico, seriam identificados enquanto antígenos e desencadeariam a ativação das células imunes periféricas (Nociti *et al.*, 2020).

Apesar da ausência de consenso a respeito de seu início, a resposta imunológica auto-reativa, de fato, se estabelece no SNC. Nesse contexto, são observadas alterações na função da barreira hematoencefálica, que se torna permissiva à entrada de células imunes periféricas (Kirk *et al.*, 2003). Células TCD4⁺ e TCD8⁺ são encontradas em autópsias de indivíduos com EM (Martin *et al.*, 1993; Dornmair *et al.*, 2003). Além destes, vários outros tipos celulares, de células tanto periféricas, tais como macrófagos, monócitos, linfócitos B, mastócitos, células dendríticas, quanto residentes, a exemplo de astrócitos e micróglia, estão envolvidos ativamente no processo neuroinflamatório que se forma no SNC (Hemmer *et al.*, 2006). O microambiente do SNC é completamente alterado pela grande liberação de citocinas e quimiocinas, além de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e metaloproteinases que degradam a matriz tecidual (Miljkovic e Spasojevic, 2013; Dargahi *et al.*, 2017). Por conseguinte, observa-se a ocorrência de gliose reativa, degradação da bainha de mielina, lesão axonal, perda neuronal, juntamente à formação de lesões ou placas na substância branca, com consequente prejuízo na condução do impulso nervoso. As lesões da EM podem se estabelecer em quaisquer regiões cerebrais, justificando a vasta gama de sintomas que podem ser desenvolvidos pelos pacientes (Agrawal *et al.*, 2013).

1.3. Astrócitos na Esclerose Múltipla

Os astrócitos representam o tipo celular mais abundante no SNC de mamíferos e desempenham uma série de funções imprescindíveis à manutenção do SNC, tais como participação no tônus vascular e na homeostase de íons, glutamato e água, suporte trófico e do desenvolvimento neuronal, formação, modulação e eliminação de sinapses, funções bioenergéticas e antioxidantes, manutenção da barreira-hematoencefálica, entre outras (Rothhammer e Quintana, 2015; Liddelw e Barres, 2017; Kim *et al.*, 2019).

A partir da ocorrência de processos danosos no SNC, a exemplo de neuroinflamação, neurodegeneração e isquemia, os astrócitos deixam o estado homeostático e sofrem modificações da expressão gênica, de modo que são desenvolvidos pelo menos dois tipos distintos de populações astrocitárias reativas. Essas populações foram, inicialmente, denominadas A1 e A2, de modo semelhante à terminologia previamente estabelecida para macrófagos e micróglia (Liddelw *et al.*, 2017). Contudo, admite-se que é possível que exista um espectro de populações astrocitárias com perfis transcricionais e desempenho de funções diferentes entre si (Liddelw e Barres, 2017).

Os astrócitos A1, por exemplo, são populações que, ao deixarem de realizar funções homeostáticas, tornam-se neurotóxicas, participam da morte de neurônios e oligodendrócitos e assumem perfil pró-inflamatório. Por sua vez, os astrócitos A2 apresentam funções anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Liddelw *et al.*, 2017).

Desse modo, durante as modificações desencadeadas pela EM, os astrócitos podem desempenhar papéis antagônicos a depender de sua polarização. A partir da ativação astrocitária por citocinas secretadas por células TCD4⁺ auto-reativas, os astrócitos contribuem com a progressão da doença, pela liberação de quimiocinas, que promovem a migração de células imunes periféricas para o SNC (Moore *et al.*, 2011). Além disso, secretam fatores solúveis que induzem a apoptose de células epiteliais da barreira hematoencefálica e promovem a diminuição da expressão de proteínas das junções comunicantes presentes na barreira, ocasionando a ruptura da estrutura, o que facilita ainda mais o acesso das células imunes auto-reativas ao SNC (Moore *et al.*, 2011). Os astrócitos reativos causam dano axonal direto, além de

contribuírem com a ativação leucocitária e microglial, de modo que há intensificação dos danos neuronais e da mielina (Moore *et al.*, 2011). É possível também que astrócitos reativos inibam o recrutamento, a diferenciação e a sobrevivência de células progenitoras de oligodendrócitos, o que dificulta a remielinização (Yi *et al.*, 2019). Por outro lado, pode haver a polarização de populações astrocíticas neuroprotetoras, que favorecem a sobrevivência neuronal e o reparo tecidual e promovem a diferenciação e proliferação de células precursoras de oligodendrócitos, secretam citocinas anti-inflamatórias, enzimas anti-oxidantes, bem como moléculas envolvidas na restauração da barreira hematoencefálica (Yi *et al.*, 2019).

Os astrócitos são componentes relevantes tanto nas lesões ativas agudas, em que há formação de infiltrado inflamatório, quanto nas lesões crônicas da EM, em que predominam perda axonal e desmielinização (Yi *et al.*, 2019). Desse modo, postula-se que seria importante modular a reatividade astrocítica para favorecer o perfil anti-inflamatório e neuroprotetor no contexto da neuroinflamação e neurodegeneração que se estabelecem na doença.

Por fim, foi visto que a ativação de mGluR5 nos astrócitos favorece a recaptação glutamatérgica por essas células (Morel *et al.*, 2014; Higashimori *et al.*, 2013). Desse modo, a modulação dessa classe de receptores torna-se interessante considerando-se o componente excitotóxico que se estabelece na EM (Gonsette, 2008).

1.4. Glutamato e neurodegeneração na EM

Entre os componentes da patologia da EM, encontra-se, também, a perda neuronal por excitotoxicidade (Shafaroudi *et al.*, 2018). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC de mamíferos e é mantido em concentrações mínimas (0.5-4 μM) no meio extracelular, sendo que o aumento dos níveis glutamatérgicos na fenda sináptica resulta na estimulação neuronal excitatória excessiva com consequente morte celular (McDonald e Johnston, 1990; Shafaroudi *et al.*, 2018).

Os astrócitos são componentes fundamentais na manutenção da homeostase, uma vez que são as células responsáveis pela captação de glutamato das sinapses, por

meio dos transportadores de glutamato dos tipos 1 e 2 (EAAT1 e EAAT2), e subsequente conversão do neurotransmissor à glutamina. A glutamina é liberada por eles para o ambiente extracelular e captada pelos neurônios, que a utilizam para nova síntese de glutamato (Gonsette, 2008).

Já foi observado aumento nos níveis de glutamato no líquido e nas lesões agudas de pacientes da EM (Stover *et al.*, 1997; Srinivasan *et al.*, 2005). Viu-se também que o modelo murino da doença, o qual desenvolve encefalomielite autoimune experimental (EAE), apresenta diminuição da expressão de EAAT1 e EAAT2 em astrócitos (Ohgoh *et al.*, 2002). Além disso, em cérebros *post-mortem* de pacientes que tiveram as formas progressivas da EM, também foi vista diminuição da expressão de EAAT1 e EAAT2 em oligodendrócitos presentes ao redor de lesões ativas na substância branca (Werner *et al.*, 2001). Desse modo, a diminuição da recaptação glial de glutamato colabora com o aumento dos níveis extracelulares do neurotransmissor (Macrez *et al.*, 2016).

Vários outros processos também parecem estar associados ao aumento dos níveis extracelulares de glutamato durante a EM. A liberação de glutamato é aumentada em função da lesão celular, bem como da atividade das células presentes no infiltrado inflamatório e no parênquima tecidual, tais como células dendríticas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e micróglia (Gonsette, 2008; Macrez *et al.*, 2016). Além disso, também ocorre alteração no metabolismo glutamatérgico. Viu-se que em lesões ativas na substância branca de pacientes das formas progressivas da EM há aumento da expressão da enzima glutaminase, que é responsável pela síntese de glutamato a partir de glutamina (Werner *et al.*, 2001).

1.5. Sinalização glutamatérgica e moduladores alostéricos para o mGluR5

O glutamato se liga aos seus receptores, que podem ser dos tipos ionotrópicos ou metabotrópicos. Entre os receptores ionotrópicos tem-se os de N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato. Eles são compostos por proteínas integrais de membrana, cujos domínios se unem para a formação de canais iônicos, capazes de se abrir a partir da ligação do agonista (Traynelis *et al.*, 2010). Por sua vez, os receptores metabotrópicos são subdivididos

nos grupos I (mGluR1 e mGluR5), II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8), de acordo com a homologia de suas sequências, da seletividade para agonistas específicos e da ativação de diferentes mecanismos de transdução de sinais. Eles são formados por domínios transmembranares e se encontram acoplados à proteína G, de modo que, após a ligação do glutamato, é desencadeada uma cascata de sinalização intracelular (Pin e Duvoisin, 1995).

O mGluR5 é acoplado à proteína Gq, que é ativada pela ligação do glutamato, e segundo a via clássica, estimula a atividade da fosfolipase C β 1 (PLC β 1), que cliva fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). O IP3 se liga aos seus receptores no retículo endoplasmático, causando liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares (**Figura 1**). Por sua vez, Ca²⁺ e DAG contribuem para a ativação da proteína quinase C (PKC) (Nakanishi *et al.*, 1998; Kawabata *et al.*, 1996). À jusante, encontram-se as vias de sinalização de c-Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), entre outros efetores enzimáticos associados à sinalização de mGluRs. A partir da sinalização de mGluR5, desencadeia-se, por exemplo, mais liberação de glutamato, o que pode contribuir com a excitotoxicidade, bem como a atividade de BDNF, que promove a sobrevivência neuronal, crescimento e diferenciação de neurônios imaturos (Li *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2004; Page *et al.*, 2006; Acheson *et al.*, 1995). Alternativamente, a ativação do mGluR5 pode ainda ativar outras cascatas de sinalização, que envolvem, por exemplo, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), bem como o complexo protéico formado pela associação entre Homer e PIKE-L, que leva à ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da proteína quinase B (AKT) cujos efeitos estão associadas à prevenção da apoptose, crescimento celular e sobrevivência neuronal (Mao *et al.*, 2005; Rong *et al.*, 2003; Ledonne e Mercuri, 2020).

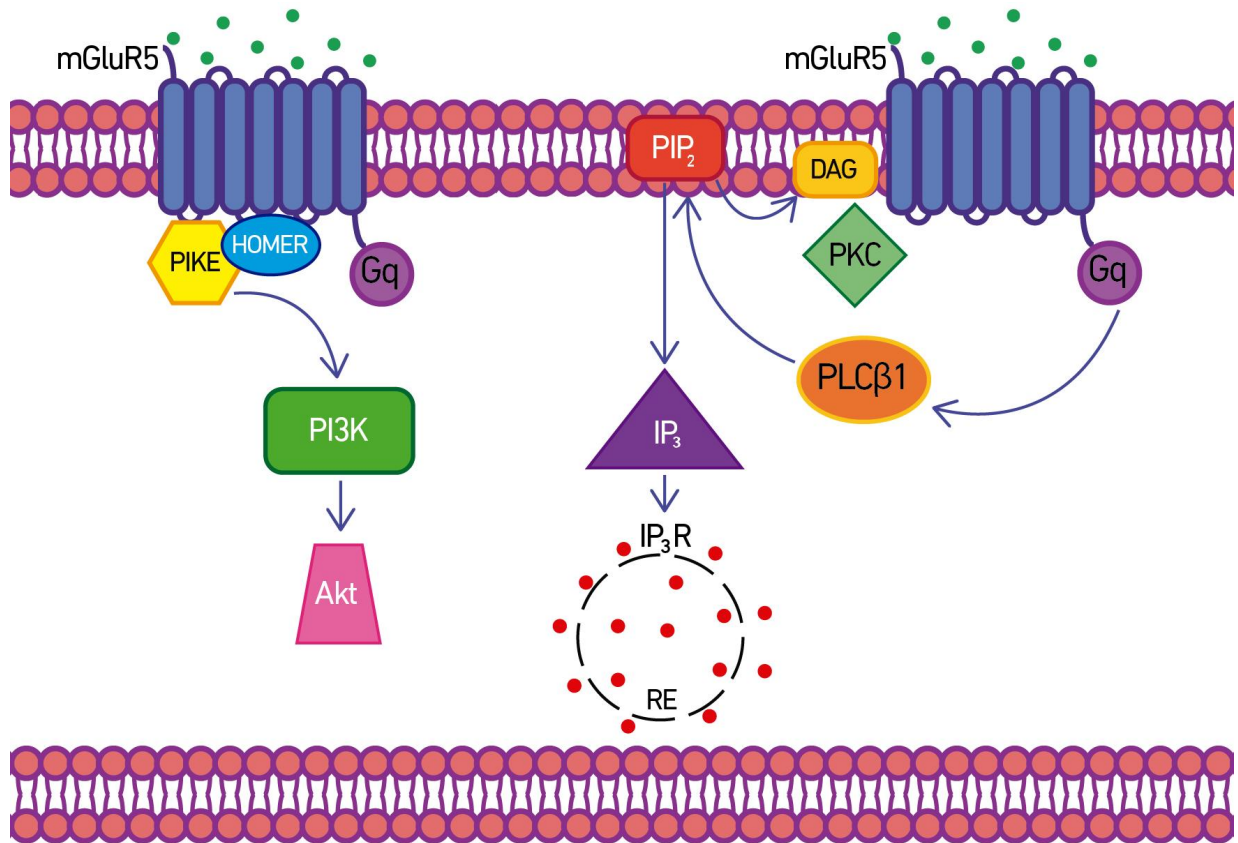


Figura 1. Modelo ilustrativo das vias de sinalização ativadas pela ligação do glutamato ao mGluR5. A ligação do glutamato ao mGluR5 pode desencadear diferentes vias de sinalização intracelulares. Pela via clássica, há ativação da proteína Gq, que ativa fosfolipase C β 1 (PLC β 1), que cliva fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em 1,2,-diacilglicerol (DAG) e inositol inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), que se liga a seus receptores intracelulares (IP₃R) presentes no retículo endoplasmático (RE), culminando na liberação de cálcio. Alternativamente, pode ocorrer ativação da sinalização de vias relacionadas à neuroproteção, envolvendo o complexo Homer-PIKE, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B (Akt). Fonte: Arquivo próprio.

Foi visto que a expressão de mGluR5 se encontra aumentada em astrócitos reativos presentes em regiões de lesões ativas de pacientes apresentando EM, bem como nos astrócitos presentes nas lesões no corpo caloso do modelo murino induzido por cuprizona (Geurts *et al.*, 2003; Newcombe *et al.*, 2008; Fulmer *et al.*, 2014). Para o modelo murino EAE, foi observado um aumento de mGluR5 em todo o cérebro, porém, nesse estudo, não foi feita a distinção do tipo celular envolvido (Sulkowski *et al.*, 2009). De acordo com a literatura, a inibição de mGluR5, por meio do tratamento com um antagonista de sua função, o 2-metil-6-feniletinil piridina (MPEP), em modelo murino da EM, não altera a expressão de citocinas pró-inflamatórias ou de transportadores de glutamato no cérebro dos animais e também não afeta a

progressão dos sinais relacionados ao desenvolvimento da EAE (Sulkowski *et al.*, 2013; Sulkowski *et al.*, 2014). Por outro lado, o tratamento com agonistas para receptores metabotrópicos de glutamato, o ácido trans-1S,3R-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico (ACPD) e com o agonista para mGluR5, 2-cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG), no modelo murino cuprizona, foi capaz de aumentar a expressão de BDNF em astrócitos e de proteínas componentes da mielina, como MOG, MBP e PLP1 (Fulmer *et al.*, 2014; Saitta *et al.*, 2021).

De modo geral, os sítios ortostéricos, aos quais se ligam agonistas e antagonistas, são conservados entre diferentes tipos de receptores metabotrópicos. Contudo, existem sítios alternativos, ou seja, alostéricos, menos conservados entre diferentes receptores e que, portanto, proporcionam ligações mais específicas e a ativação seletiva de vias de interesse (Nickols *et al.*, 2014). VU0409551 (**Figura 2**), por exemplo, é um modulador alostérico positivo (MAP) para o mGluR5 capaz de reduzir a morte neuronal induzida pelo insulto de glutamato e de ativar vias de neuroproteção *in vitro* (Doria *et al.*, 2018).

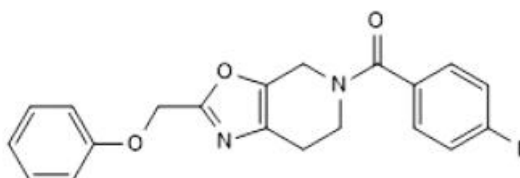


Figura 2. Fórmula estrutural do MAP para mGluR5 VU0409551. VU0409551 é um modulador alostérico positivo seletivo para o mGluR5. Promove a ativação exclusiva de mGluR5 e não contribui para a ativação de outros receptores metabotrópicos glutamatérgicos. Fonte: Tocris, 2022. Disponível em: https://tocris.com/products/vu-0409551_5693#product-details

Foi observado também, que outro MAP para o mGluR5, denominado VU0360172 (**Figura 3**), é capaz de conferir neuroproteção em modelo murino de injúria cerebral traumática experimental (TBI), além de inibir a sinalização pró-inflamatória e alterar o perfil de reatividade microglial *in vitro* (em células murinas de cultura primária e na linhagem BV2), favorecendo a expressão do fenótipo anti-inflamatório, pró-reparo (Loane *et al.*, 2014). Considerando-se os efeitos benéficos ocorridos a partir da ativação de mGluR5, torna-se interessante a investigação do uso de moduladores

alostéricos positivos (MAPs) para esse receptor, capazes de favorecer sua atividade de forma mais acurada.

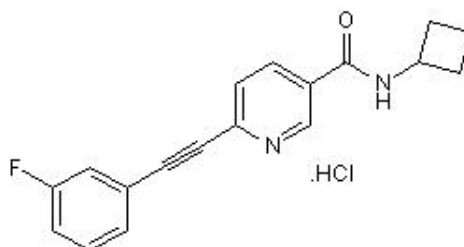


Figura 3. Fórmula estrutural do MAP para mGluR5 VU0360172. VU0360172 é um modulador alostérico positivo seletivo para o mGluR5. Promove a ativação exclusiva de mGluR5 e não contribui para a ativação de outros receptores metabotrópicos glutamatérgicos. Fonte: Tocris, 2022. Disponível em: https://www.tocris.com/products/vu-0360172-hydrochloride_4323#product-details

Atualmente, não existe nenhuma abordagem terapêutica para a EM capaz de combinar efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, tais como os oferecidos pelos referidos MAPs para mGluR5 (Nociti *et al.*, 2020; Doria *et al.*, 2018; Loane *et al.*, 2014). Portanto, no contexto da EM, a utilização de drogas como estas seria extremamente interessante, sobretudo, porque as formas progressivas da doença carecem de novas abordagens terapêuticas, uma vez que os tratamentos disponíveis para a EM são efetivos principalmente na diminuição da progressão da doença em sua forma remitente-recorrente, em função dos efeitos anti-inflamatórios e não atuam sobre a perda axonal e a neurodegeneração de longo prazo, que ocorrem durante os subtipos progressivos e fases mais tardias da EM (Gonsette, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório do MAP do mGluR5, o VU0409551, em culturas de astrócitos derivados de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs) estimuladas com citocinas pró-inflamatórias associadas à EM, TNF α e IL-1 β .

2.2. Objetivos específicos

- Obter culturas de astrócitos a partir de células-tronco neurais (NSCs) derivadas de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs).
- Estabelecer um protocolo de estímulo pró-inflamatório em culturas de astrócitos derivadas de hiPSCs por meio da administração de fator de necrose tumoral α (TNF- α , 10ng/mL) e interleucina 1 β (IL-1 β , 10ng/mL), na presença ou na ausência de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, 20ng/mL ou 200 ng/mL), ao longo de 4 e 24h.
- Avaliar o sucesso do estímulo pró-inflamatório mensurando a expressão de fatores associados à inflamação (IL-1 β , IL-6) e à reatividade astrocitária (C3) através de RT-qPCR.
- Avaliar o efeito do tratamento com VU0409551 (1 μ M e 10 μ M) sobre a expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 através de RT-qPCR, em astrócitos estimulados com insulto pró-inflamatório.
- Avaliar o efeito do tratamento com VU0409551 (1 μ M e 10 μ M) sobre a expressão de BDNF, GNR e EAAT1, através de RT-qPCR, em astrócitos estimulados com insulto pró-inflamatório.
- Avaliar o efeito do tratamento com VU0409551 (1 μ M e 10 μ M) sobre os níveis de liberação de glutamato por astrócitos estimulados com TNF- α , IL-1 β por meio de fluorimetria.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo e manutenção de NSCs

Células tronco neurais (NSCs) derivadas de células tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs) de indivíduos saudáveis foram gentilmente cedidas pelo Prof. Stevens Rehen (UFRJ/Instituto D'or). Utilizou-se a linhagem CF2, cujos dados encontram-se disponíveis na **Tabela 1** de **Anexos**. $2,0 \times 10^6$ NSCs foram plaqueadas em placas de 60 mm (Sarstedt) revestidas previamente com Geltrex 1x (Gibco) por 30 minutos a 37°C. Utilizou-se meio de expansão de NSCs [NEM, 50% Advanced DMEM/F12 (Gibco), 50% Neurobasal (Gibco), Suplemento de Indução Neural 1x (Gibco) com 1% de penicilina-estreptomicina (P/S) (Gibco)], trocado a cada 2 dias até a obtenção de 100% de confluência das células. Todas as culturas celulares foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C e 5% de CO₂.

3.2. Diferenciação das NSCs em astrócitos

O protocolo de diferenciação dos astrócitos a partir de NSCs foi realizado como descrito em Yan e colaboradores (2013). A monocamada de NSCs 100% confluenta foi submetida a duas lavagens com solução tamponada de fosfato sem cálcio ou magnésio (PBS 1x -/-) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente com solução de Accutase (Gibco, 1:1 em PBS 1x -/-). Em seguida, as células foram transferidas para falcon de 15 mL (Sarstedt) e centrifugadas a 300 g por 4 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado celular foi ressuspendido em meio de diferenciação de astrócitos [MDA, DMEM/F12 (Gibco), suplemento N-2 1x (Gibco), 1% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina]. $1,25 \times 10^6$ células foram plaqueadas. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias durante 3 semanas, transferindo-se a cultura para garrafas T75 (Sarstedt) tratadas com Geltrex 1x e subsequentemente T175 (Sarstedt) após o alcance de 100% de confluência. A seguir, as células, já no estágio de astrócitos imaturos (1 semana após a diferenciação), foram transferidas para novas garrafas T175 tratadas previamente com Geltrex 0,5x, e a seguir, para novas garrafas 175 não revestidas por Geltrex de modo a selecionar positivamente as células diferenciadas (células indiferenciadas

carecem de matriz para aderência). Os astrócitos foram cultivados em meio de maturação de astrócitos [MMA, DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina-estreptomicina] até a completude da maturação (5 semanas após a diferenciação).

3.3 Plaqueamento dos astrócitos

Após atingirem a maturação e 100% de confluência em garrafas T175, os astrócitos, em monocamada, foram lavados com PBS 1x -/- por duas vezes e em seguida incubados com solução de tripsina (Gibco, 1:1 em PBS 1x -/-) por 5 minutos a 36°C. Após terem se despreendido da garrafa, os astrócitos foram coletados e transferidos para placas de 6 poços (Sarstedt), na quantidade de 7×10^4 astrócitos por poço, em 1,5 mL de MMA. No dia seguinte, realizou-se a troca de meio, adicionando 2 mL de MMA em cada poço.

3.4 Carenciamento das culturas astrocitárias

Três dias antes do início dos tratamentos as culturas celulares de astrócitos foram lavados três vezes com PBS 1x -/-. Em seguida, foram adicionados 2 mL/poço de DMEM/F12 1% penicilina-estreptomicina.

3.5 Tratamento das culturas astrocitárias

VU0409551 (Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery, Vanderbilt Institute of Chemical Biology) foi diluído em DMSO (Sigma Aldrich). As citocinas TNF- α (Biolegend), IL-1 β (Biolegend) e GM-CSF (Biolegend) foram diluídas em albumina sérica bovina 0.1% (Sigma Aldrich) e administradas de modo simultâneo às culturas astrocitárias. As concentrações finais por poço dos estímulos foram: 10 ng/ mL para TNF- α , 10 ng/ mL para IL-1 β , 20 ng/ mL e 200ng/ mL para GM-CSF, 1 μ M e 10 μ M para VU0409551.

Como controles foram utilizados astrócitos em que se administrou apenas com DMSO (diluyente da droga), BSA (veículo da citocina) e VU0409551 na concentração de 1 μ M, além de astrócitos tratados apenas com VU0409551 na concentração de 10 μ M. As amostras de todos os controles foram coletadas ao final de 24h.

3.6 Transcrição reversa e PCR quantitativa

O RNA total foi extraído de cada amostra pelo método de TRIzol® (Thermo Fisher), em conformidade com as recomendações do fabricante. A seguir, quantificou-se o material por meio de espectrofotômetro Multiskan GO NanoDrop Microplate (Thermo Scientific). Procederam-se também análises da qualidade da extração do RNA.

Para a reação de transcrição reversa foram adotadas as seguintes condições: 10 minutos a 70°C, 10 minutos a 4°C, 1 hora a 42°C, 15 minutos a 70°C. Utilizou-se volume total de 20 μ L para a reação, sendo: 1x de solução tampão 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 625 μ L de dNTPs, 10 μ M DTT, 15 ng/mL iniciadores randômicos e transcriptase reversa em água livre de nucleases.

O DNA complementar (cDNA) obtido foi diluído na proporção de 1:10 em água livre de nucleases e utilizado para a realização da PCR quantitativa (qPCR, plataforma QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System) em 10 μ L de reação [(tampão: 200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl, 10% de Polietilenoglicol 400, 10% de Formamida), 3,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 200 nM de iniciadores senso e antissenso, 0,1x SyBr Green (Applied Biosystems), 1M betaína e Taq DNA Polimerase]. As reações ocorreram em três etapas, sendo a primeira de 3 minutos a 95°C. Na segunda, foram realizados 40 ciclos compostos por 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e 15 segundos a 72°C. A última etapa foi de 15 segundos a 95°C.

Quantificou-se a expressão dos seguintes genes: TNF- α , IL-1 β , C3, IL-6, IL-10, GNR, BDNF, EAAT1, além de importina 8 (IPO8), proteína ribossômica ácida 60S P0 (RPLP0). As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se disponíveis na **Tabela 2 em Anexos**.

Realizaram-se triplicatas técnicas para todas as amostras. As variações da expressão gênica de cada alvo foram normalizadas relativamente à expressão de IPO8 e RPLP0 e calculadas por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em relação ao grupo controle DMSO.

3.7 Ensaio de liberação de glutamato

O protocolo utilizado foi descrito por Gobira e colaboradores (2015) com modificações. As amostras de meio condicionado foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 300 rcf. Coletaram-se os sobrenadantes.

O glutamato presente nos meios condicionados coletados das culturas de astrócitos foi medido por meio de um espectrofluorímetro (Synergy 2, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, EUA). A medição ocorre de forma indireta pelo aumento da fluorescência devido à redução de NADP⁺ a NADPH de forma concomitante à conversão de glutamato em α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase II (GDH).

As amostras de meio condicionado foram adicionados, em triplicatas para cada condição, a uma placa de 96 poços e incubadas com mix de reação KRH 10 mg/mL (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, pH 7.4), 1 mM NADP (Sigma Aldrich), e 1 mM CaCl₂ (Sigma Aldrich). A seguir, foi realizada a leitura basal por 5 minutos, seguida de leitura por 5 minutos após adição de 50 unidades/poço de GDH (Sigma Aldrich). Finalmente, adiciona-se glutamato padrão (5 nM/ μ L, Sigma Aldrich) para a realização da curva de calibração da fluorescência com leitura por 5 minutos.

O experimento foi realizado a 37°C, sendo o comprimento de onda de excitação 360 nm e o de emissão 450 nm. Os níveis de glutamato foram normalizados pela quantidade total de RNA por amostra (obtida por espectrofotometria descrita anteriormente).

4. ANÁLISE DOS DADOS

O software GraphPad Prism (versão 8.0.1, GraphPad Software Inc.) foi utilizado para a realização dos gráficos e das análises estatísticas. Os resultados estão demonstrados como média + erro padrão da média (SEM) e foram calculados a partir de pelo menos quatro replicatas biológicas. Para a análise dos dados, utilizou-se o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados significativos testes que apresentaram valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Diferenciação de astrócitos maduros a partir de NSCs derivadas de hiPSCs

Estudos anteriores avaliaram as contribuições astrocitárias no contexto da neuroinflamação durante a EM em astrócitos murinos (Liddelow *et al.*, 2017). No presente trabalho, utilizou-se astrócitos derivados de iPSCs humanas, os quais apresentam um caráter translacional elevado, facilitando o teste de drogas que poderão ser utilizadas na clínica médica no futuro. Para tal, utilizou-se NSCs derivadas de hiPSCs, as quais foram submetidas aos protocolos de diferenciação de astrócitos ao longo de três semanas, gerando astrócitos imaturos, como demonstrado nas **Figuras 4.a e b**. Depois dessa etapa de diferenciação, as células foram submetidas a um protocolo de maturação de astrócitos durante cinco semanas. Desse modo, foram obtidos astrócitos maduros, que expressam GFAP, vimentina e S100 β , segundo caracterização prévia para o estabelecimento do protocolo adotado no presente trabalho, representados nas **Figuras 4.c e d**.

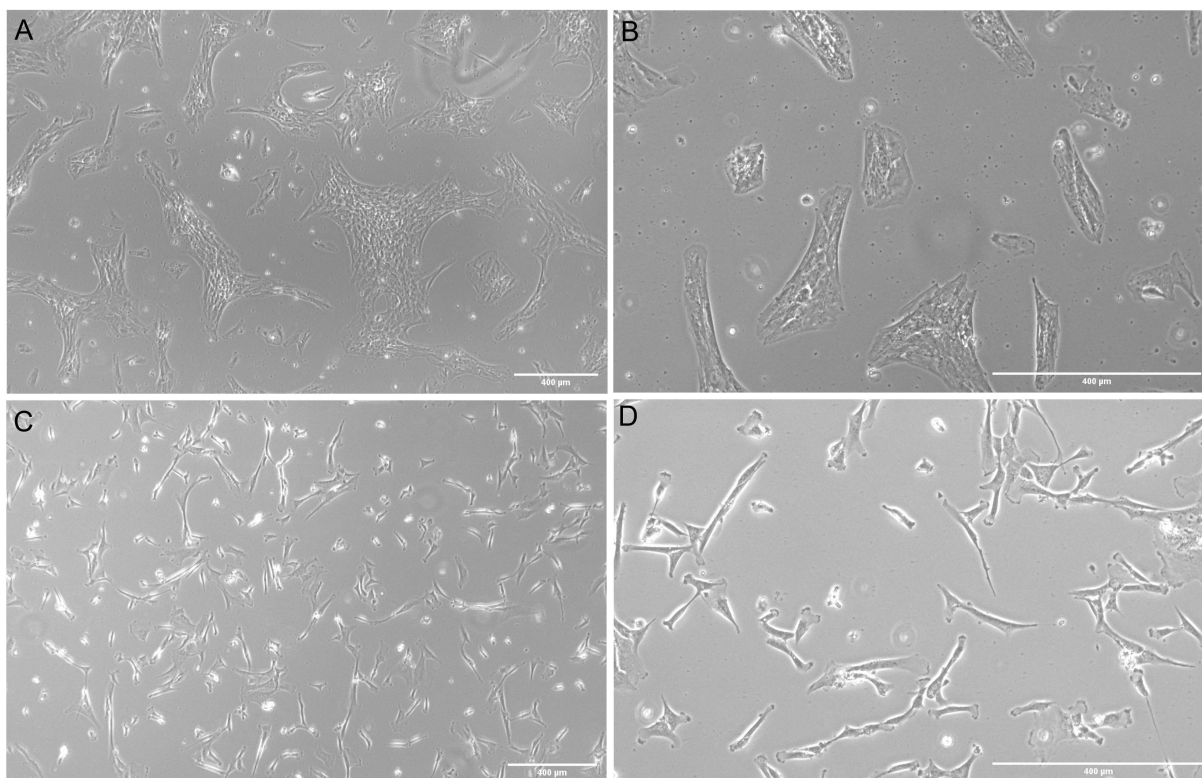


Figura 4. Astrócitos diferenciados a partir de NSCs. Em **A e B** observam-se astrócitos imaturos após 1 semana de diferenciação. Em **B e C** têm-se astrócitos maduros, após 8 semanas de diferenciação. Imagens de microscopia de campo

claro obtidas a partir da submissão de NSCs aos protocolos de diferenciação e maturação de astrócitos. Barras de escala igual a 400 μ m.

5.2 Estabelecimento do estímulo pró-inflamatório

Visando estabelecer um modelo *in vitro* para o estudo da EM, buscamos na literatura citocinas capazes de produzir um estímulo pró-inflamatório nas culturas de astrócitos derivadas de hiPSCs. Já havia sido demonstrado que o estímulo com TNF- α e IL-1 β é capaz de induzir um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios em astrócitos derivados de hiPSCs, bem como a reatividade em astrócitos murinos *in vitro*, havendo aumento da expressão dos genes pró-inflamatórios na presença de GM-CSF de maneira concentração-dependente (Perriot, *et al.*, 2018; Wheeler *et al.*, 2020).

Objetivando-se determinar se o estímulo com GM-CSF reforçaria a ação sinérgica pró-inflamatória de IL-1 β e TNF- α , culturas de astrócitos derivados de hiPSCs foram estimuladas com TNF- α 10 ng/mL e IL-1 β 10 ng/mL, na ausência ou na presença de GM-CSF 20 ou 200 ng/mL por 4 e 24 h. Em seguida, os níveis de expressão de fatores pró-inflamatórios foram avaliados. Foi observado aumento da expressão de IL-1 β nos astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β , tanto na ausência quanto na presença de GM-CSF, nas concentrações de 20 ou 200 ng/mL e nos tempos de 4h (**Figura 5.a**) e 24h (**Figura 5.b**), quando comparados a culturas de astrócitos não estimuladas. Entretanto, o tratamento com GM-CSF não exacerbou a expressão de IL-1 β induzida por TNF- α e IL-1 β .

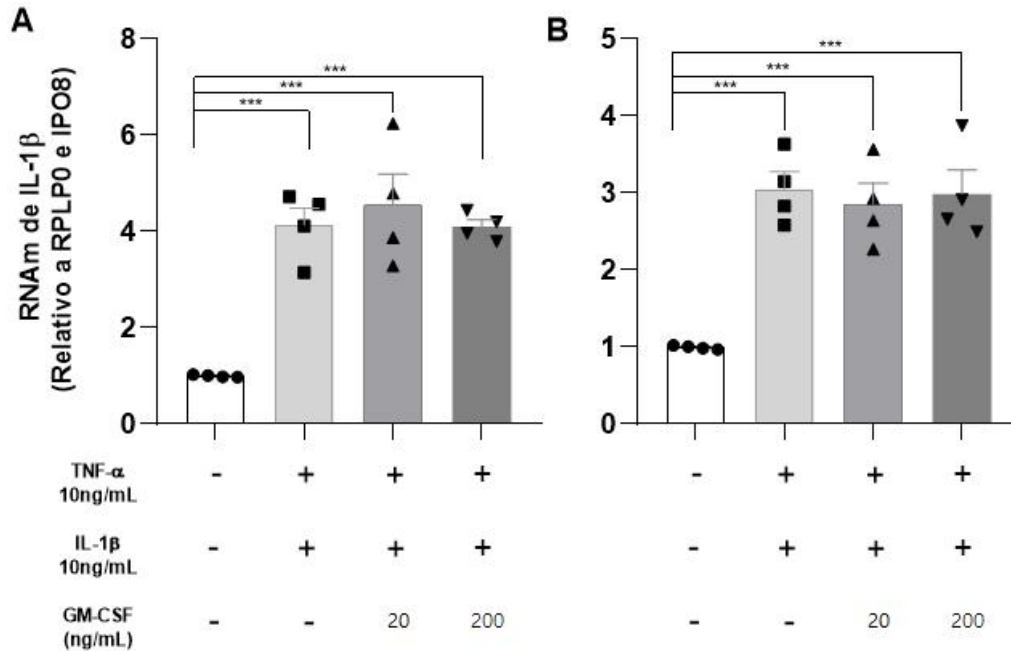


Figura 5. Estímulo pró-inflamatório aumenta os níveis de RNAm para IL-1 β em astrócitos. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para IL-1 β determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 20 ou 200 ng/mL de GM-CSF (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. *** indicam $p < 0,001$. ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas.

A IL-6 apresenta um grande pleiotropismo de funções e está entre as citocinas pró-inflamatórias liberadas após a ativação de células da glia (Tanaka *et al.*, 2014; Burmeister e Marriott, 2018). IL-6 também é encontrada em níveis aumentados no plasma de pacientes com EM (Krei *et al.*, 1991). Levando em consideração a possível contribuição de IL-6 na patologia da EM, a expressão de IL-6 foi avaliada nas culturas astrocíticas estimuladas visando validar a efetividade dos estímulos pró-inflamatórios. Como resultado, observa-se que, para o tempo de 4h, não se observa aumento da expressão de IL-6 em função do estímulo pró-inflamatório (**Figura 6.a**). Entretanto, houve aumento da expressão de IL-6 em astrócitos estimulados com TNF- α 10 ng/mL e IL-1 β 10 ng/mL, na presença de GM-CSF 200 g/mL, em comparação com astrócitos que não receberam estímulo pró-inflamatório. Para o tempo de 24h (**Figura 6.b**), houve aumento da expressão IL-6 para todas as condições testadas em comparação ao controle. Esses resultados sugerem que a

associação de GM-CSF ao estímulo TNF- α e IL-1 β pode contribuir para um aumento da expressão de IL-6.

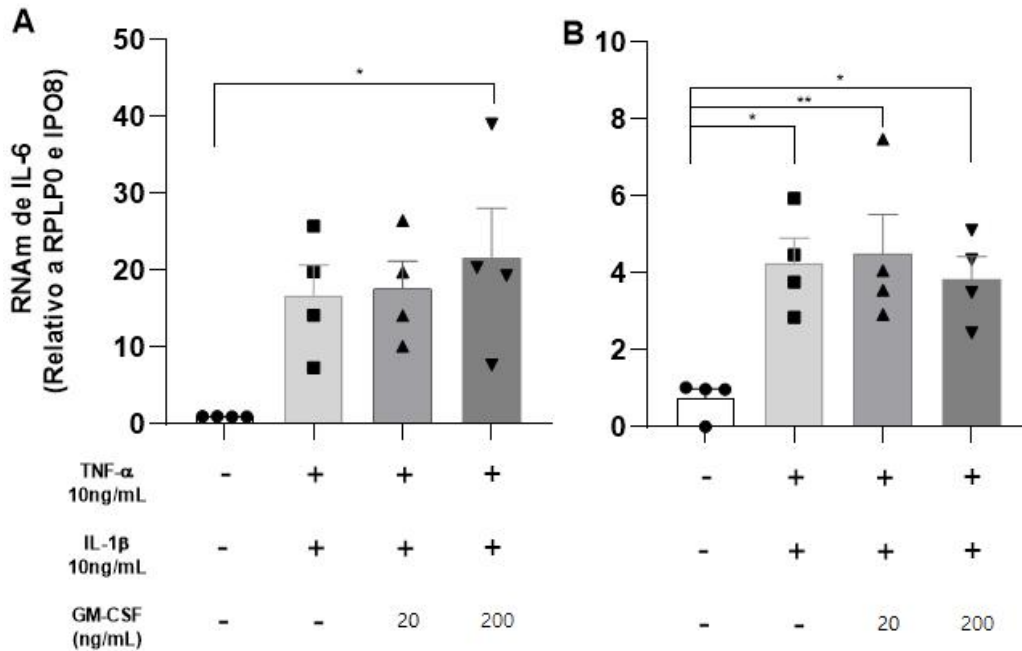


Figura 6. Estímulo pró-inflamatório com GM-CSF contribui para aumento dos níveis de RNAm para IL-6 em astrócitos. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para IL-6 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 20 ou 200 ng/mL de GM-CSF (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. *indica $p < 0,05$, ** indicam $p < 0,01$. Anova de uma via, teste de Tukey para comparações múltiplas.

De acordo com a literatura, componentes do complemento como C1q e C3 são encontrados em níveis elevados em lesões da EM (Absinta *et al.*, 2021). Além disso, o aumento da expressão de C3 tem sido associado à reatividade astrocitária (Liddelow e Barres, 2017; Ponath *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Desse modo, a expressão desse fator do complemento foi avaliada após a estimulação pró-inflamatória com TNF- α , IL-1 β e GM-CSF ao longo dos tempos de 4h (**Figura 7.a**) e 24h (**Figura 7.b**). Entretanto, não foi possível detectar variações na expressão de C3 nos astrócitos estimulados nas condições testadas em comparação ao controle não estimulado.

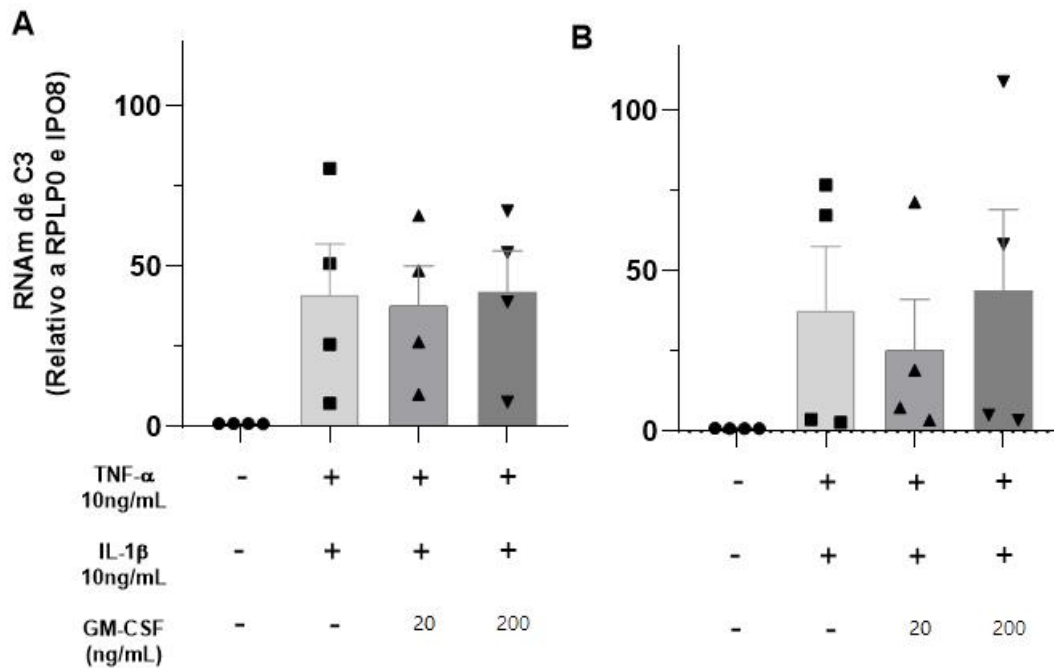


Figura 7. Não há variação na expressão relativa de C3 em astrócitos após estímulo pró-inflamatório. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para C3 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 20 ou 200 ng/mL de GM-CSF (n=4) ao longo de 4 (A) ou 24h (B). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. Anova de uma via.

5.3 Avaliação do tratamento com VU0409551 na expressão de citocinas após estímulo pró-inflamatório em astrócitos

Tendo em vista que o estímulo com GM-CSF suplantou a estimulação com TNF- α e IL-1 β apenas quanto à expressão de IL-6 na concentração de 200 ng/mL por 4h, consideramos a estimulação restrita a TNF- α e IL-1 β suficiente enquanto insulto pró-inflamatório para as culturas astrocíticas.

Considerando-se que VU0409551 é um MAP do mGluR5 com potencial efeito neuroprotetor mediante insulto de glutamato e que outros MAPs apresentam efeitos sobre a reatividade microglial, induzindo perfil anti-inflamatório *in vitro* (Doria *et al.*, 2018; Loane *et al.*, 2014), foi realizado o tratamento com VU0409551 em astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β . Em seguida, a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias foi quantificada através de RT-qPCR.

Não houve aumento da expressão de IL-1 β a partir do tratamento de astrócitos com VU0409551 nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M em comparação ao controle não tratado (**Figura 8**). Além disso, não foi possível detectar variação significativa na expressão relativa de IL-1 β em astrócitos após o estímulo com TNF- α e IL-1 β para o tempo de 4h em comparação ao controle não estimulado (**Figura 8.a**). Para o tempo de estimulação de 24h, houve aumento na expressão de IL-1 β em astrócitos que receberam o insulto de TNF- α e IL-1 β em comparação ao controle não estimulado (**Figura 8.b**). Não houve diferença de expressão de IL-1 β quando se compara astrócitos estimulados com TNF- α + IL-1 β e astrócitos tratados com TNF- α + IL-1 β + VU0409551 1 μ M (**Figura 8.b**). Contudo, os resultados sugerem que o tratamento com VU0409551 leva a uma diminuição da expressão de IL-1 β induzida pelo estímulo pró-inflamatório, uma vez que não houve diferença na expressão de IL-1 β entre astrócitos não estimulados e tratados com VU0409551 1 μ M + TNF- α + IL-1 β (**Figura 8.b**). Por outro lado, o tratamento com VU0409551 10 μ M não foi capaz de diminuir a expressão de IL-1 β induzida pelo estímulo pró-inflamatório.

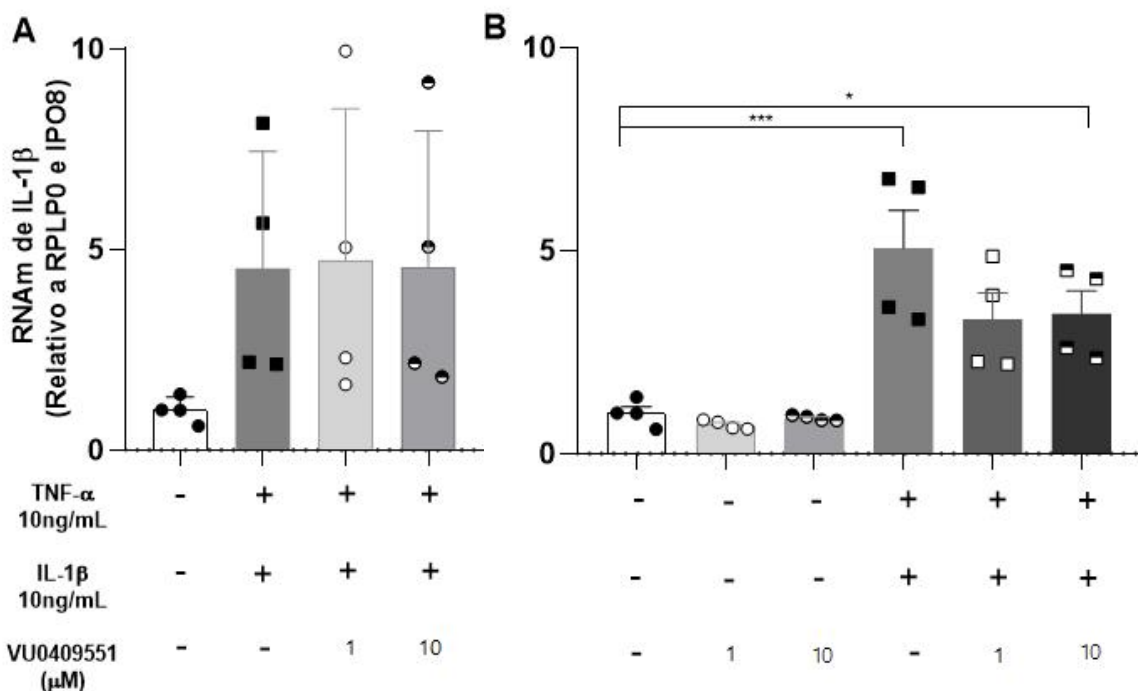


Figura 8. O aumento da expressão de IL-1 β induzido pelo tratamento de astrócitos com TNF- α e IL-1 β não é alterado por VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para IL-1 β determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e

normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. * indica $p < 0,05$ *** indicam $p < 0,001$. Anova de uma-via, teste de Tukey para comparações múltiplas.

O tratamento dos astrócitos com VU0409551 nas concentrações de 1 μM e 10 μM por 4h (**Figura 9.a**) e 24h (**Figura 9.b**) não alterou a expressão de TNF- α em comparação ao controle não tratado. Ademais, não houve aumento significativo na expressão de TNF- α em astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β para o tempo de 4h (**Figura 9.a**) em comparação ao controle não tratado. Para o tempo de 24h, houve aumento na expressão de TNF- α em astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β em comparação ao controle (**Figura 9.b**). Contudo, o tratamento com VU0409551 nas concentrações de 1 μM e 10 μM não foi capaz de diminuir a expressão de TNF- α induzida pelo estímulo pró-inflamatório.

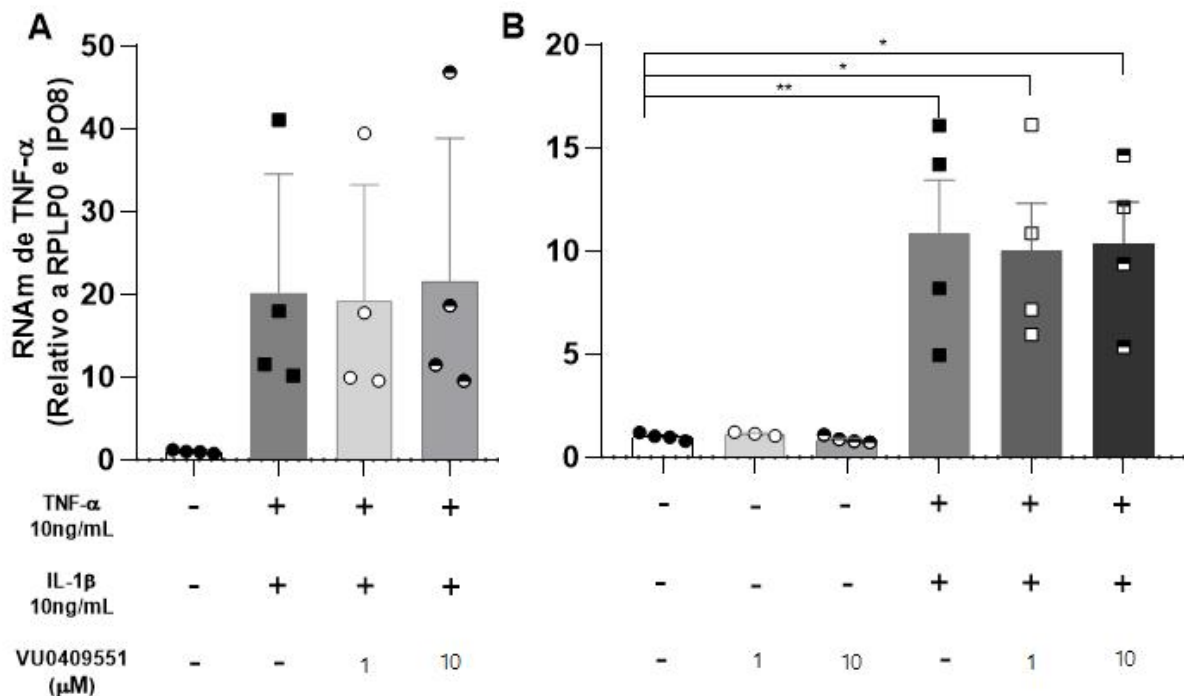


Figura 9. O aumento da expressão de TNF- α induzido pelo tratamento de astrócitos com TNF- α e IL-1 β não é alterado por VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para TNF- α determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μM ou 10 μM de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. * indica $p < 0,05$ ** indicam $p < 0,01$. Anova de uma-via, teste de Tukey para comparações múltiplas.

No caso da IL-6, observou-se que o tratamento dos astrócitos com VU0409551, nas concentrações de 1 e 10 μM levou a um aumento da expressão dessa citocina, quando comparado a astrócitos não tratados (**Figura 10**). Entretanto, para o tempo de 4h, não foi possível observar aumento da expressão de IL-6 em astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β , na presença ou na ausência de VU0409551, em comparação ao controle não estimulado (**Figura 10.a**). Para o tempo de 24h (**Figura 10.b**), houve aumento na expressão relativa de IL-6 nos astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β , tanto na ausência quanto na presença de VU0409551, quando comparados ao controle não estimulado.

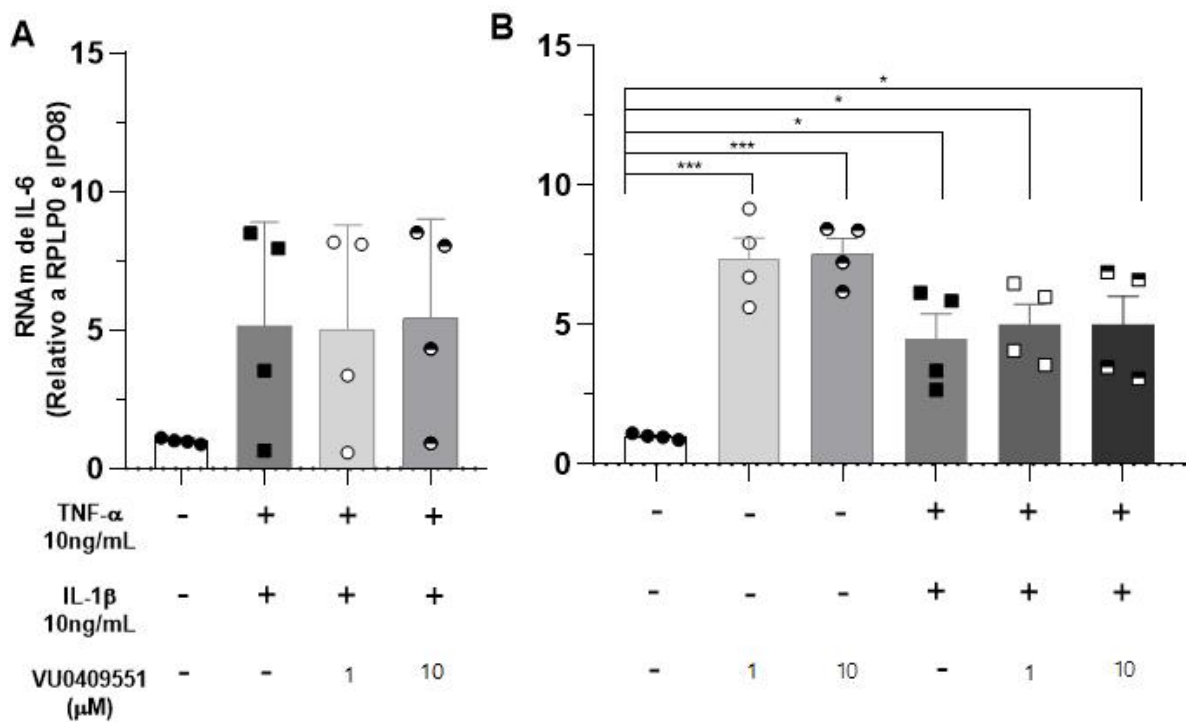


Figura 10. Tratamento com VU0409551 induz aumento de IL-6. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para IL-6 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μM ou 10 μM de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. * indica p < 0,05 *** indicam p < 0,001, Anova de uma-via, teste de Tukey para comparações múltiplas.

A expressão de IL-10 foi medida nas culturas de astrócitos para a avaliação de possível efeito anti-inflamatório do tratamento com VU0409551. IL-10 apresenta papel fundamental na manutenção da homeostase no SNC e é produzida

tardiamente por astrócitos e micróglia, contribuindo para a transição entre as fases inflamatória e de reparo da resposta imunológica (Gutierrez-Murgas *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2001; Burmeister e Marriott, 2018). A literatura relata que a expressão de IL-10 está relacionada à inibição da reatividade astrocitária e do desenvolvimento da EAE em modelo murino para a EM (Balasingam *et al.*, 1996; Cua *et al.*, 2001).

Entretanto, não foram detectadas variações estatisticamente significativas na expressão relativa de IL-10 em astrócitos após o tratamento com TNF- α e IL-1 β , na presença ou na ausência de VU0409551, para os tempos de 4h (**Figura 11.a**) ou de 24h (**Figura 11.b**) em comparação com o controle não estimulado.

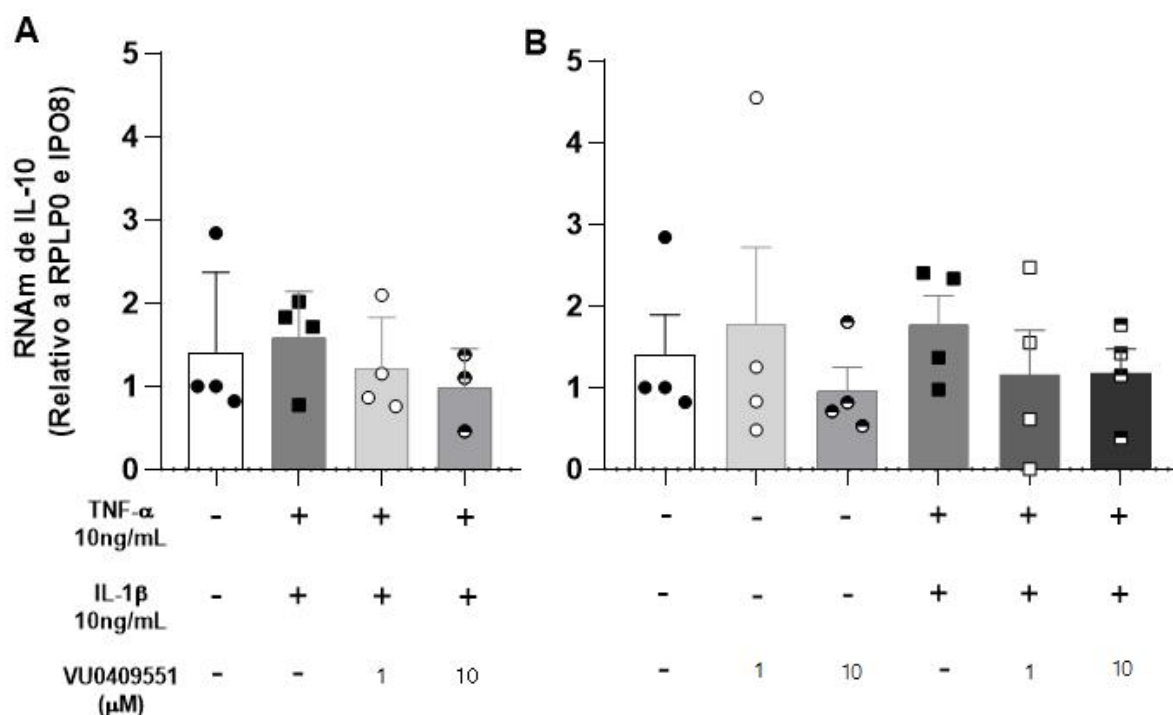


Figura 11. Não há variação na expressão relativa de IL-10 em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para IL-10 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. Anova de uma-*via*.

5.4 Avaliação do tratamento com VU0409551 na expressão de BDNF e GNR após estímulo pró-inflamatório em astrócitos

BDNF é expresso principalmente por neurônios e astrócitos reativos, tendo diversas funções relacionadas à diferenciação, maturação e sobrevivência neuronal (Lee *et al.*, 2012; Acheson *et al.*, 1995). Além disso, é encontrado em níveis aumentados em lesões cerebrais ativas e inativas na EM (Stadelmann *et al.*, 2002), o que sugere um provável mecanismo neuroprotetor dessa neurotrofina durante a inflamação (Kerschensteiner *et al.*, 1999). Portanto, neste estudo, a expressão de BDNF também foi avaliada (**Figura 12**). Contudo, não foram detectadas alterações estatisticamente significativas na expressão de BDNF em função do tratamento com TNF- α e IL-1 β , na ausência ou na presença de VU0409551, ao longo dos tempos de 4h (**Figura 12.a**) e 24h (**Figura 12.b**), quando comparado ao controle não estimulado.

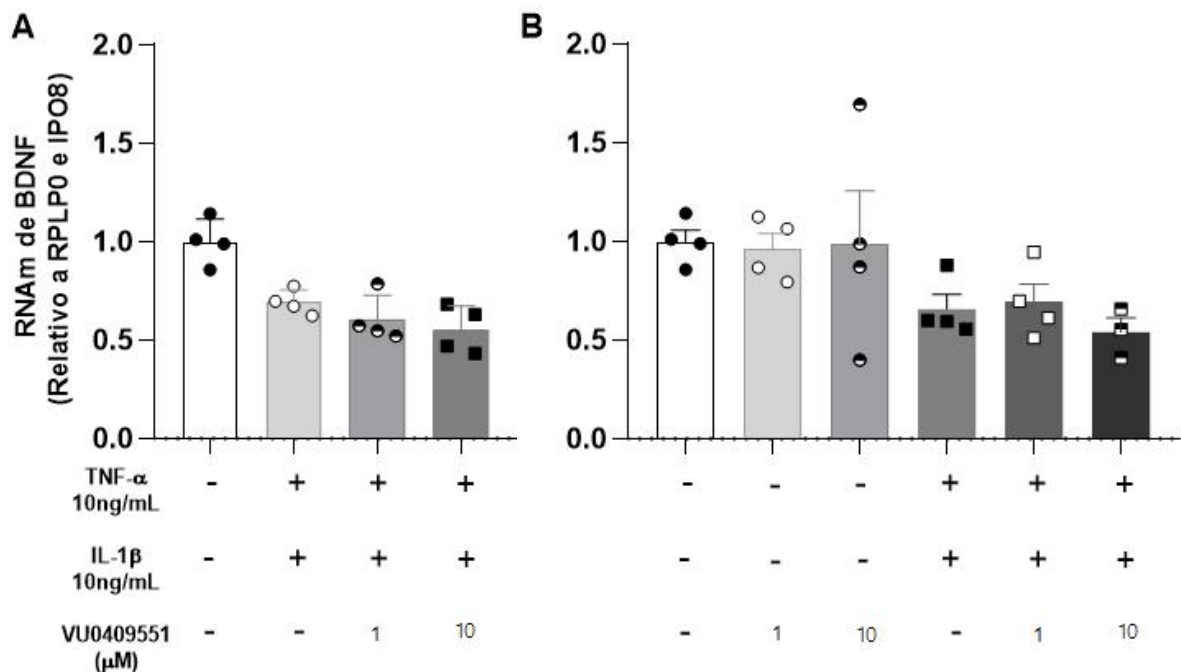


Figura 12. Não há variação na expressão relativa de BDNF em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para BDNF determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos derivados de hiPSCs estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. Anova de uma-via.

Outra proteína avaliada, que desempenha importantes funções no SNC, foi a progranulina. Progranulina participa da função, desenvolvimento e sobrevivência de neurônios e micróglia. Além disso, está relacionada à regulação da inflamação e à diminuição da reatividade astrogliar, à resposta ao estresse, entre outras funções (Rhinn *et al.*, 2022). Contudo, não houve alteração estatisticamente significativa da expressão astrocitária de progranulina após a administração de estímulo pró-inflamatório ou VU0409551 ao longo dos tempos avaliados de 4h (**Figura 13.a**) e 24h (**Figura 13.b**), quando comparado ao controle não estimulado.

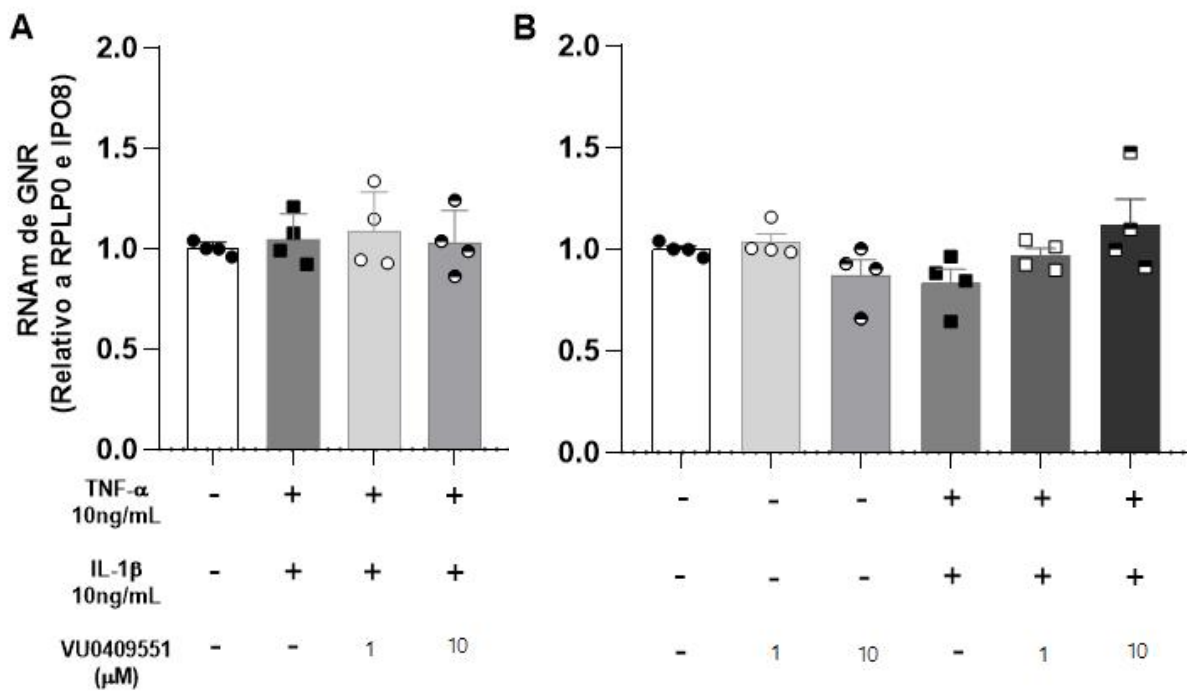


Figura 13. Não há variação na expressão relativa de GNR em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para progranulina determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos derivados de hiPSCs estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. Anova de uma-via.

5.5 Avaliação da expressão de EAAT1 astrocitária e dos níveis de glutamato nos meios condicionados de astrócitos sob insulto pró-inflamatório

Entre os componentes da fisiopatologia da EM, encontra-se a excitotoxicidade, que ocorre em função de alterações na homeostase glutamatérgica (Werner *et al.*, 2001, Macrez *et al.*, 2016, Gentile *et al.*, 2020). Há, por exemplo, diminuição da recaptação glial de glutamato (Vercellino *et al.*, 2007), tendo-se demonstrado, no modelo murino EAE, diminuição da expressão de EAAT1 e EAAT2 em astrócitos (Ohgoh *et al.*, 2002).

Dessa forma, foi realizada a avaliação da expressão astrocitária do transportador de glutamato EAAT1 após estímulo pró-inflamatório com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551 (Figura 14). Contudo, não foram detectadas alterações de expressão estatisticamente significativas de EAAT1 ao longo das condições e tempos avaliados de 4h (Figura 14.a) e 24h (Figura 14.b).

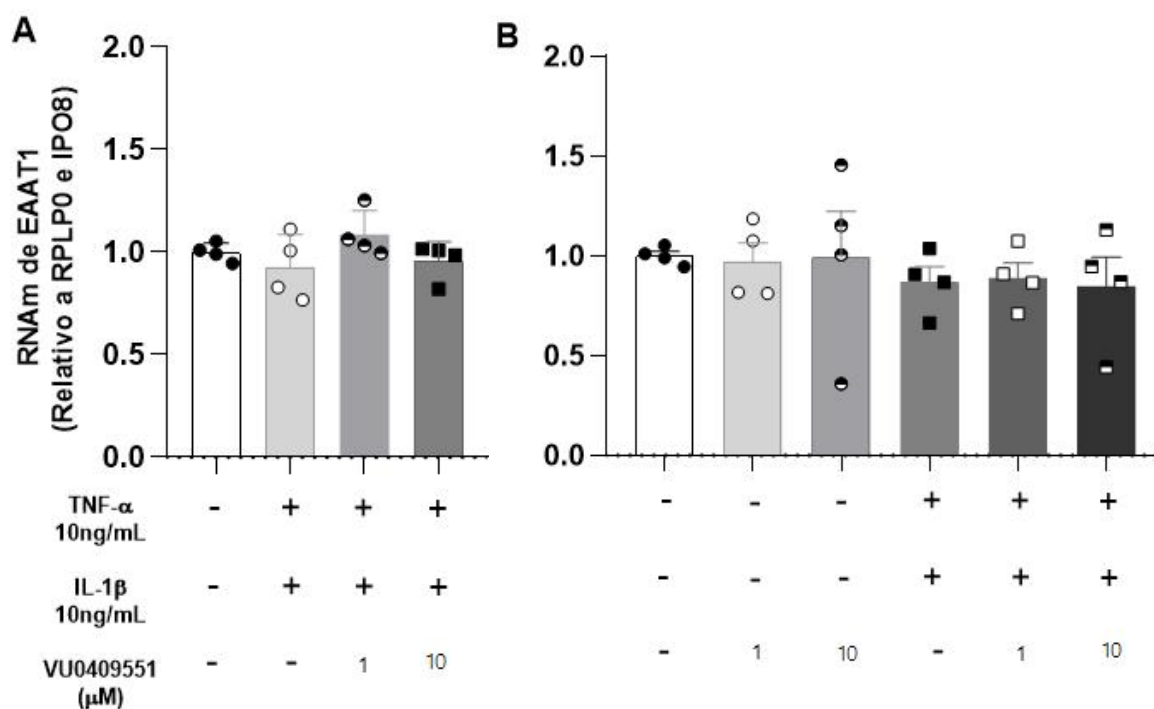


Figura 14. Não há variação na expressão relativa de EAAT1 em astrócitos após estímulo com TNF- α e IL-1 β e tratamento com VU0409551. Os gráficos apresentam os níveis (média + SEM) de RNAm para EAAT1 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNAm foram extraídas de culturas celulares de astrócitos derivados de hiPSCs estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 (n=4) ao longo de 4 (A) ou 24h (B). A reação de qPCR foi

realizada em triplicata e normalizada pela média dos níveis de RNAm de IPO8 e RPLP0. Anova de uma-via.

Avaliamos também se os níveis de glutamato nos meios condicionados das culturas de astrócitos estariam alterados devido ao estímulo pró-inflamatório com 10ng/mL TNF- α e 10 ng/mL IL-1 β e se ocorreriam alterações desses níveis em função do tratamento com VU0409551 nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. Como resultado, não foram observadas variações estatisticamente significativas nos níveis de liberação de glutamato a partir do estímulo com as citocinas pró-inflamatórias ou do tratamento com VU0409551 (**Figura 15**).

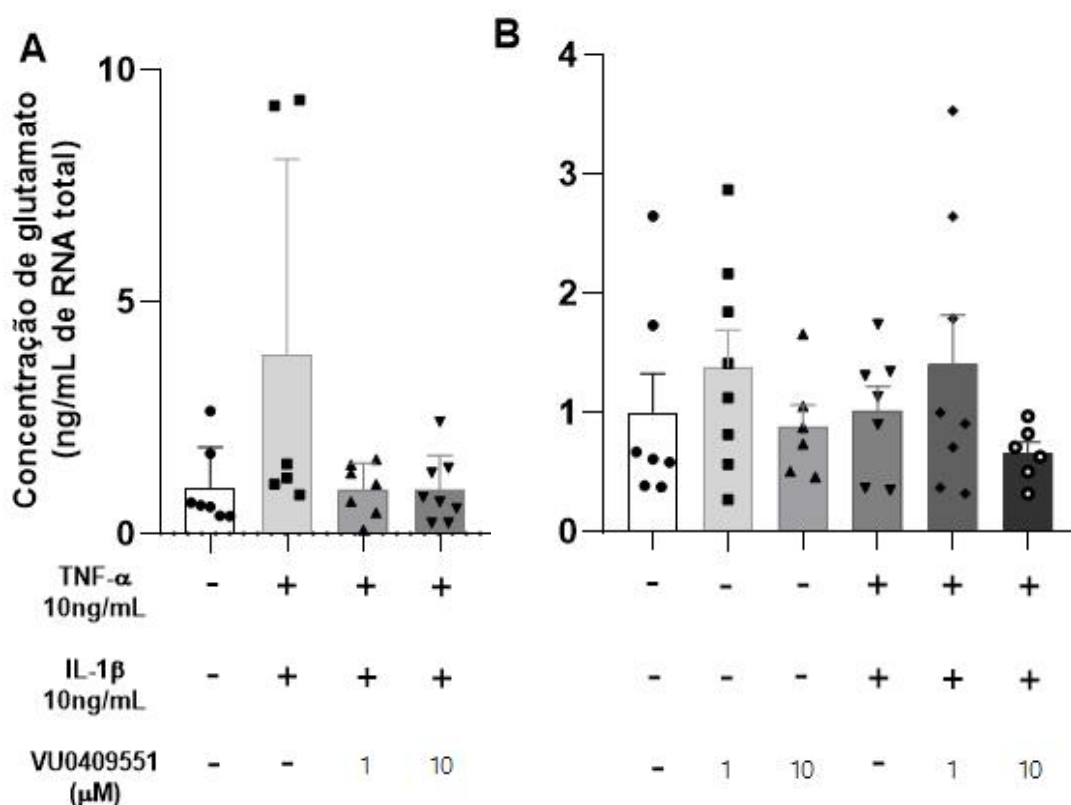


Figura 15. Não há variação da liberação de glutamato em meio condicionado de astrócitos após estímulo pró-inflamatório e tratamento com VU0409551. Os gráficos mostram os níveis (média + SEM) de glutamato determinados por fluorimetria em meios condicionados. As amostras foram coletadas de culturas celulares de astrócitos estimuladas com 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL IL-1 β , 1 μ M ou 10 μ M de VU0409551 ao longo de 4 (**A**) ou 24h (**B**). O ensaio fluorimétrico foi realizado em triplicatas e normalizado pela concentração de RNAm (ng/mL) de cada amostra. Anova de uma-via (n=8).

6. DISCUSSÃO

Um dos objetivos desse trabalho foi analisar se a associação de GM-CSF à TNF- α e IL-1 β levaria a uma ativação inflamatória mais robusta em comparação ao estímulo sinérgico proporcionado pelas duas citocinas (Paludan, 2000). De acordo com o trabalho de Wheeler *et al.* (2020), a adição de GM-CSF ao estímulo com TNF- α e IL-1 β é capaz de aumentar a expressão dos genes pró-inflamatórios Csf2, IL-6, CCL2 e IL-1 β . No presente trabalho, observou-se que o estímulo com TNF- α e IL-1 β foi o fator preponderante para o aumento da expressão de IL-1 β e de IL-6, de modo que GM-CSF não induziu efeito pró-inflamatório mais robusto que o gerado pelas duas citocinas. Em Wheeler *et al.* (2020), as análises são desenvolvidas em culturas primárias de astrócitos murinos. Essas células apresentam respostas significativas em relação à expressão dos genes pró-inflamatórios avaliados, quando estimuladas com concentrações de 100 ng/mL de TNF- α e 50 ng/mL de IL-1 β em diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-8} , na presença ou ausência de 100 ug/mL de GM-CSF, bem como com 2 a 2000 ng/mL de GM-CSF administradas isoladamente. Contudo, no presente trabalho, observou-se que no caso de astrócitos humanos o estímulo com GM-CSF nas concentrações testadas não potencializa o efeito de TNF- α e IL-1 β , além de não haver efeito concentração-dependente de GM-CSF. Em virtude desses resultados, neste trabalho se optou por utilizar TNF- α e IL-1 β , na ausência de GM-CSF, como estímulo pró-inflamatório.

Observou-se também que o aumento da expressão de IL-1 β induzido pelo estímulo pró-inflamatório de TNF- α e IL-1 β não se mostrou reprodutível ao longo do estudo. Durante o teste das condições para o insulto, a estimulação pró-inflamatória durante 4h (**Figura 5**) aumentou a expressão de IL-1 β em comparação ao controle não estimulado, o que não se repetiu para o mesmo tempo e estímulo na etapa de avaliação dos efeitos do VU0409551 (**Figura 8**). Considerando-se que no presente trabalho os testes foram realizados em astrócitos pertencentes a uma única linhagem celular (**Tabela 1**), seria interessante realizar novos ensaios utilizando outras linhagens celulares, o que possibilitaria a obtenção de dados mais robustos. Assim, temos como perspectiva futura a realização de novos experimentos utilizando astrócitos derivados de hiPSCs de outros indivíduos, os quais poderiam ser mais ou menos responsivos à estimulação pró-inflamatória. Além disso, a grande

variabilidade dos resultados indicam que o “n” amostral deve ser maior, aumentando a confiabilidade nos resultados.

A citocina IL-6 foi inicialmente identificada como fator de diferenciação de células B e além disso, apresenta um enorme pleiotropismo de funções, pois está relacionada à hematopoiese, à inflamação, à resposta imune, além de participar da neurogênese de neurônios e glia, tanto na homeostase quanto na resposta à injúria no SNC (Hirano *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 2014; Erta *et al.*, 2012). No contexto da EM, foi observado que a expressão de IL-6 está relacionada à sobrevivência e proteção de oligodendrócitos em lesões inativas de pacientes (Schonrock *et al.*, 2000). Além disso, a administração de IL-6 foi capaz de acelerar a recuperação no modelo murino EAE, além de aumentar a expressão periférica de IL-10 e TGF- β e diminuir a expressão de TNF- α nesse modelo (Marco *et al.*, 2001). Contudo, IL-6 tem efeitos pró-inflamatórios, sobretudo em consequência de sua produção por células T, B e dendríticas. De fato, no modelo murino EAE, demonstrou-se que IL-6 é importante na promoção dos sinais clínicos relacionados à doença (Molnarfi *et al.*, 2013; Heink *et al.*, 2017). No presente trabalho, observou-se que o tratamento com VU0409551, de modo independente do estímulo pró-inflamatório, foi capaz de induzir o aumento da expressão astrocitária de IL-6 em comparação com os astrócitos não estimulados (**Figura 10**). Considerando-se que a indução do aumento da expressão de IL-6 especificamente no SNC, em detrimento da indução de sua expressão na periferia, poderia ser benéfica no contexto da EM, torna-se interessante investigar melhor as consequências da indução da expressão de IL-6 em astrócitos promovida pelo tratamento com VU0409551.

Para os demais alvos analisados, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-10, GNR, BDNF e EAAT1, os resultados obtidos não demonstram um efeito protetor ou anti-inflamatório do VU0409551 em astrócitos estimulados com TNF- α e IL-1 β . Entretanto, o estímulo pró-inflamatório também não foi efetivo para alterar os níveis de IL-10, GNR, BDNF. Assim, para uma melhor caracterização dos efeitos do VU0409551, análises de outros alvos moleculares seriam necessárias, tais como quimiocinas, a exemplo de CCL2, CX3CL1, CCL5 (Cui *et al.*, 2020), que têm função imprescindível nas fases agudas da neuroinflamação durante a EM, e outros fatores importantes, como TGF β , IFN γ , IL12, IL17, IL22, entre outros (Wang *et al.*, 2018).

De acordo com a literatura, o estímulo pró-inflamatório por meio de TNF- α e IL-1 β é capaz de promover a diminuição da expressão de transportadores de glutamato, contribuindo para o aumento extracelular das concentrações do neurotransmissor. Já foi visto que, em oligodendrócitos fetais humanos, a incubação com TNF- α diminui a expressão de EAAT1 inibindo a recaptação de glutamato em 75% (Pitt *et al.*, 2003). Por sua vez, o estímulo com IL-1 β em fatias cerebelares do modelo murino EAE leva a uma rápida diminuição da expressão de EAAT1 (Mandolesi *et al.*, 2013). Entretanto, observa-se que o estímulo com TNF- α e IL-1 β nas condições de tempo e concentrações avaliadas neste trabalho não alteraram as concentrações de glutamato nos meios condicionados de culturas compostas apenas por astrócitos humanos derivados de iPSCs. Novamente, seria importante aumentar o “n” amostral, bem como realizar os mesmos experimentos em astrócitos derivados de outras linhagens de hiPSC, que podem ser mais ou menos responsivas à estimulação, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados.

Ademais, apesar de termos selecionado para a composição do estímulo pró-inflamatório citocinas relacionadas à EM, a neuroinflamação que se desenvolve na doença cursa com a ação concomitante de uma gama de fatores do sistema imunológico advindos de outras células residentes do SNC, bem como de células infiltrantes do sistema imune periférico, de modo que, o estímulo por nós utilizado reproduz a indução da reatividade astrocitária de modo extremamente restrito. Desse modo, seria interessante a adição de outros fatores pró-inflamatórios relacionados à reatividade astrocitária para a composição do estímulo, a exemplo de MBP como desenvolvido no trabalho de Calderon *et al.* (2006), bem como a avaliação isolada e conjunta de outros tipos celulares. Nesse sentido, torna-se interessante o uso de modelos tridimensionais, como as neuroesferas. Sabe-se, por exemplo, que astrócitos crescidos em modelos tridimensionais apresentam morfologia mais complexa, com um maior número de projeções, menor expressão de GFAP, e portanto, reproduzem melhor as condições da homeostase cerebral (Liddelow e Barres, 2017). Além disso, as neuroesferas, desenvolvidas a partir de NSCs contam com a presença de outros tipos celulares que se originam a partir dessas células progenitoras, incluindo neurônios e oligodendrócitos (Kobolak *et al.*, 2020). Desse modo, a avaliação de possíveis tratamentos, como o por meio de VU0409551, poderia ser mais interessante quando se utiliza neuroesferas, já que

permitiria analisar simultaneamente a indução ou inibição da reatividade astrocitária, além de possível efeito neuroprotetor sobre neurônios, bem como o efeito final sobre a sobrevivência de oligodendrócitos mediante insultos relacionados à EM. Finalmente, levando-se em consideração também a importante interação entre astrócitos e micróglia durante a neuroinflamação, tornam-se interessantes novos testes avaliando-se micróglia, em experimentos de co-cultura e de adição de meio condicionado. Nesse caso, seria interessante utilizar o GM-CSF para a estimulação pró-inflamatória, uma vez que esse fator tem influência na atividade microglial (Dikmen *et al.*, 2020).

7. CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho, buscou-se investigar o potencial mecanismo anti-inflamatório de VU0409551, pois a associação entre a neuroproteção, já caracterizada em cultura neuronal *in vitro*, e a diminuição da inflamação seria de grande relevância no contexto de desordens como a EM. Entretanto, o potencial anti-inflamatório de VU0409551 não foi confirmado pelos resultados. Contudo, a continuidade das análises torna-se necessária em função das limitações inerentes ao estudo, a exemplo do “n” amostral adotado, do uso de uma única linhagem astrocitária, bem como da avaliação de um único tipo celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSINTA M., MARIC D., GHARAGOZLOO M., GARTON T., SMITH M., JIN J., FITZGERALD K., SONG A., LIU P., LIN J., WU T., JOHNSON K., MCGAVERN D., SCHAFFER D., CALABRESI P., REICH D. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. **Nature**. 97, v. 7878, p. 709-714, Sep 2021.

ACHESON A., CONOVER J., FANDL J., DECHIARA T., RUSSELL M., et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**, n. 30374, v. 6521, p. 450-3. Mar. 1995.

AGRAWAL, S. M.; WILLIAMSON, J.; SHARMA, R.; KEBIR, H. *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. **Brain**, 136, n. Pt 6, p. 1760-1777, Jun 2013.

ASCHERIO, A. Environmental factors in multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother**, 13, n. 12 Suppl, p. 3-9, Dec 2013.

BAI, Z.; CHEN, D.; WANG, L.; ZHAO, Y. *et al.* Cerebrospinal Fluid and Blood Cytokines as Biomarkers for Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 226 Studies With 13,526 Multiple Sclerosis Patients. **Front Neurosci**, 13, p. 1026, 2019.

BALASINGAM, V., & YONG, V. W. (1996). Attenuation of Astroglial Reactivity by Interleukin-10. **The Journal of Neuroscience**, 16, p. 2945, 1996.

BEECHAM, A. H.; PATSOPOULOS, N. A.; XIFARA, D. K. *et al.* International Multiple Sclerosis Genetics, C.; Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. **Nat Genet**, 45, n. 11, p. 1353-1360, Nov 2013.

BISHOP, M.; RUMRILL, P. D. Multiple sclerosis: Etiology, symptoms, incidence and prevalence, and implications for community living and employment. **Work**, 52, n. 4, p. 725-734, 2015.

BURMEISTER, A. R.; MARRIOTT, I. The Interleukin-10 Family of Cytokines and Their Role in the CNS. **Front Cell Neurosci**, 12, p. 458, 2018.

CALABRESE, M.; FAVARETTO, A.; MARTINI, V.; GALLO, P. Grey matter lesions in MS: from histology to clinical implications. **Prion**, 7, n. 1, p. 20-27, Jan-Feb 2013.

CALDERON T., EUGENIN E., LOPEZ L., KUMAR S., HESSELGESSER J., RAINE C., BERMAN J. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. **J Neuroimmunol.** 177, p. 27-39, Aug 2006.

COTSAPAS, C.; MITROVIC, M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. **Clin Transl Immunology**, 7, n. 6, p. e1018, 2018.

CUA, D. J.; HUTCHINS, B.; LAFACE, D. M.; STOHLMAN, S. A. *et al.* Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, 166, n. 1, p. 602-608, Jan 1 2001.

CUI, L. Y.; CHU, S. F.; CHEN, N. H. The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. **Int Immunopharmacol**, 83, p. 106314, Jun 2020.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, 65, n. 1, p. 1, 2001

DARGAHI N., KATSARA M., TSELIOS T., ANDROUTSOU M., DE COURTEN M., *et al.* Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. **Brain Sci.** 7, v.7, p.78, Jul 2017.

DIKMEN, H. O.; HEMMERICH, M.; LEWEN, A.; HOLLNAGEL, J. O. *et al.* GM-CSF induces noninflammatory proliferation of microglia and disturbs electrical neuronal network rhythms in situ. **J Neuroinflammation**, 17, n. 1, p. 235, Aug 11 2020.

DOBSON, R.; GIOVANNONI, G. Multiple sclerosis - a review. **Eur J Neurol**, 26, n. 1, p. 27-40, Jan 2019.

DORIA, J. G.; DE SOUZA, J. M.; SILVA, F. R.; OLMO, I. G. *et al.* The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. **J Neurochem**, 147, n. 2, p. 222-239, Oct 2018.

DORNMAIR , K.; GOEBELS N.; WELTZIEN HU; WEKERLE H.; HOHLFELD R. T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. **Am J Pathol**, 163, n.4, p. 1215-1226, 2003.

DUQUETTE P. ,PLEINES J. , GIRARD M. , CHAREST L. , SENEAL-QUEVILLON M., MASSE C. The Increased Susceptibility of Women to Multiple Sclerosis. **The Canadian Journal Of Neurological Science**. 1992.

ERTA M., QUINTANA A., HIDALGO J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci**, v.8, n.9, p. 1254-66, Oct 2012.

FILIPPI M., ROCCA M. MRI evidence for multiple sclerosis as a diffuse disease of the central nervous system. **J Neurol**. 252, Nov 2005

FULMER C., VONDRAN M., STILLMAN A., HUANG Y., HEMPSTEAD B., DREYFUS C. Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. **J Neurosci**. 34, v. 24, p. 8186-96, Jun 2014.

GENTILE, A.; DE VITO, F.; FRESEGNA, D.; RIZZO, F. R. *et al*. Peripheral T cells from multiple sclerosis patients trigger synaptotoxic alterations in central neurons. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 46, n. 2, p. 160-170, Feb 2020.

GEURTS, J. J.; WOLSWIJK, G.; BO, L.; VAN DER VALK, P. *et al*. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. **Brain**, 126, n. Pt 8, p. 1755-1766, Aug 2003.

GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. **Cell J**, 19, n. 1, p. 1-10, Apr-Jun 2017.

GOBIRA, P., VILELA, L. , GONÇALVES, B. , SANTOS, R., DE OLIVEIRA, A., VIEIRA, L., *et al*. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **Neurotoxicology**, 50, p. 116–121, 2015.

GONSETTE, R. E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. **J Neurol Sci**, 274, n. 1-2, p. 48-53, Nov 15 2008.

GUTIERREZ-MURGAS, Y. M.; SKAR, G.; RAMIREZ, D.; BEAVER, M. *et al.* IL-10 plays an important role in the control of inflammation but not in the bacterial burden in *S. epidermidis* CNS catheter infection. **J Neuroinflammation**, 13, n. 1, p. 271, Oct 13 2016.

HAUSER S., CREE B. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. **Am J Med**, 133, n.12, p.1380-1390, Dec 2020.

HEINK, S.; YOGEV, N.; GARBERS, C.; HERWERTH, M. *et al.* Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. **Nat Immunol**, 18, n. 1, p. 74-85, Jan 2017.

HEMMER B., NESSLER S., ZHOU D., KIESEIER B., HARTUNG H. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. **Nat Clin Pract Neurol**, p. 201-11, Apr 2006.

HIGASHIMORI H., MOREL L., HUTH J., LINDEMANN L., DULLA C., TAYLOR A., FREEMAN M., YANG Y. Astroglial FMRP-dependent translational down-regulation of mGluR5 underlies glutamate transporter GLT1 dysregulation in the fragile X mouse. **Hum Mol Genet**. 22, v. 10. p. 2041-54, May 2013.

HIRANO, T.; TAGA, T.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K. *et al.* Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82, n. 16, p. 5490-5494, Aug 1985.

HOU L., KLANN E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **J Neurosci**. 24, v. 28, p. 6352–6361, 2004.

KAWABATA S., TSUTSUMI R., KOHARA A., YAMAGUCHI T., NAKANISHI S., OKADA M. Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. **Nature**. 383, v.6595, p 89-92, Sep 1996.

KERSCHENSTEINER, M.; GALLMEIER, E.; BEHRENS, L.; LEAL, V. V. *et al.* Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? **J Exp Med**, 189, n. 5, p. 865-870, Mar 1 1999.

KIM, Y.; PARK, J.; CHOI, Y. K. The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review. **Antioxidants (Basel)**, 8, n. 5, May 5 2019.

KIRK, J.; PLUMB, J.; MIRAKHUR, M.; MCQUAID, S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. **J Pathol**, 201, n. 2, p. 319-327, Oct 2003.

KOBELT G., TEICH V., CAVALCANTI M., CANZONIERI A. Burden and cost of multiple sclerosis in Brazil. **Plos One**, 14, v. 1, 2019.

KOBOLAK, J.; TEGLASI, A.; BELLAK, T.; JANSTOVA, Z. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D-Neurospheres are Suitable for Neurotoxicity Screening. **Cells**, 9, n. 5, May 1 2020.

KREI, K.; FREDRIKSON, S.; FONTANA, A.; & LINK, H. Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, 31, n. 2, p. 147-153, 1991.

LEDONNE, A.; MERCURI, N. B. Insights on the Functional Interaction between Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRI) and ErbB Receptors. **Int J Mol Sci**, 21, n. 21, Oct 24 2020.

LEE, D. H.; GEYER, E.; FLACH, A. C.; JUNG, K. *et al.* Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. **Acta Neuropathol**, 123, n. 2, p. 247-258, Feb 2012.

LI X., LI C., YU S., CHEN J., SABAPATHY K., RUAN D. JNK1 contributes to metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression and short-term synaptic plasticity in the mice area hippocampal CA1. **Eur J Neurosci**. 25, v. 2, p. 391–396, 2007.

LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. **Immunity**, 46, n. 6, p. 957-967, Jun 20 2017.

LIDDELOW, S. A.; GUTTENPLAN, K. A.; CLARKE, L. E.; BENNETT, F. C. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, 541, n. 7638, p. 481-487, Jan 26 2017.

LOANE, D. J.; STOICA, B. A.; TCHANTCHOU, F.; KUMAR, A. *et al.* Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, 11, n. 4, p. 857-869, Oct 2014.

MACREZ, R.; STYS, P. K.; VIVIEN, D.; LIPTON, S. A.; & DOCAGNE, F. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. **The Lancet Neurology**, 15, n.10, p. 1089-1102, 2016.

MANDOLESI, G.; MUSELLA, A.; GENTILE, A.; GRASSELLI, G. *et al.* Interleukin-1beta alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. **J Neurosci**, 33, n. 29, p. 12105-12121, Jul 17 2013.

MAO L., YANG L., ARORA A., CHOE E., ZHANG G., LIU Z., *et al.* Role of protein phosphatase 2A in mGluR5-regulated MEK/ERK phosphorylation in neurons. **J Biol Chem**, 2005.

MARCO, D.; KHADEMI, A.; WALLSTROM E.; IACOBAEUS E. Curative effects of recombinant human Interleukin-6 in DA rats with protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, n.116, p. 16, 2001.

MARTIN, R.; VOSKUHL, R.; FLERLAGE, M.; MCFARLIN, D. E. *et al.* Myelin basic protein-specific T-cell responses in identical twins discordant or concordant for multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 34, n. 4, p. 524-535, Oct 1993.

MCDONALD, J. W., & JOHNSTON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research Reviews**, 15, n. 1, p. 41-70, 1990.

MILJKOVIC, D.; SPASOJEVIC, I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, 19, n. 18, p. 2286-2334, Dec 20 2013.

MOLNARFI, N.; SCHULZE-TOPPHOFF, U.; WEBER, M. S.; PATARROYO, J. C. et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. **J Exp Med**, 210, n. 13, p. 2921-2937, Dec 16 2013

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, 19, p. 683-765, 2001.

MOORE C., ABDULLAH S., BROWN A., ARULPRAGASAM A., CROCKER S. How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. **J Neurosci Res**, 89, n.1, p.13-21, Jan 2011.

MOREL L, HIGASHIMORI H, TOLMAN M, YANG Y. VGluT1+ neuronal glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. **J Neurosci**. 33, p. 10950-62, 20, Aug. 2014.

MURRAY T. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. **BMJ**, 332, p. 525–7, 2006.

NAKANISHI S., NAKAJIMA Y., MASU M., UEDA Y., NAKAHARA K., WATANABE D., YAMAGUCHI S., KAWABATA S., OKADA M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. **Brain Res.**, 26, p. 230–235, 1998.

NEWCOMBE, J.; UDDIN, A.; DOVE, R.; PATEL, B. *et al.* Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. **Brain Pathol**, 18, n. 1, p. 52-61, Jan 2008.

NICKOLS, H. H.; CONN, P. J. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. **Neurobiol Dis**, 61, p. 55-71, Jan 2014.

NOCITI V. What is the role of Brain derived neurotrophic factor in Multiple Sclerosis neuroinflammation? **Neuroimmunol Neuroinflammation**, 7, p. 291-9, 2020.

OHGOH M.; HANADA T.; SMITH T.; *et al.* Altered expression of glutamate transporters in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, n. 125, p. 170-78, 2002.

PAGE G., KHIDIR F., PAIN S., BARRIER L., FAUCONNEAU B., GUILLARD O., PIRIOU A., HUGON J. Group I metabotropic glutamate receptors activate the p70S6 kinase via both mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling pathways in rat striatal and hippocampal synaptoneurosomes. **Neurochem Int.** 49, n.4, p. 413–421, 2006.

PALUDAN, S. R. Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. **J Leukoc Biol**, 67, n. 1, p. 18-25, Jan 2000.

PERRIOT S., MATHIAS A. , PERRIARD G. , CANALES M., JONKMANS N., MERIENNE N., *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived astrocytes are differentially activated by multiple sclerosis-associated cytokines. **Stem Cell Reports**, v. 11, p. 1199–1210, November 13, 2018.

PIN, J.-P., & DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. **Neuropharmacology**, 34, n. 1, p. 1-26, 1995.

PIRKO, I.; LUCCHINETTI, C. F.; SRIRAM, S.; BAKSHI, R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. **Neurology**, 68, n. 9, p. 634-642, Feb 27 2007.

PITT, D.; NAGELMEIER, I. E.; WILSON, H. C.; RAINE, C. S. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. **Neurology**, 61, n. 8, p. 1113-1120, Oct 28 2003.

PONATH, G., LINCOLN, M., LEVINE-RITTERMAN, M. *et al.* Enhanced astrocyte responses are driven by a genetic risk allele associated with multiple sclerosis. **Nat Commun** 9, p. 5337, 2018.

REICH, D. S.; LUCCHINETTI, C. F.; CALABRESI, P. A. Multiple Sclerosis. **N Engl J Med**, 378, n. 2, p. 169-180, Jan 11 2018.

RHINN H., TATTON N., MCCAUGHEY S., KURNELLAS M., ROSENTHAL A. Progranulin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. **Trends Pharmacol Sci**, Jan 2022.

RONG, R.; AHN, J. Y.; HUANG, H.; NAGATA, E. *et al.* PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. **Nat Neurosci**, 6, n. 11, p. 1153-1161, Nov 2003.

ROTHHAMMER, V.; QUINTANA, F. J. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. **Semin Immunopathol**, 37, n. 6, p. 625-638, Nov 2015.

SAITTA K., LERCHER L., SAINATO D., PATEL A., HUANG Y., MCAULIFFE G., DREYFUS C. CHPG enhances BDNF and myelination in cuprizone-treated mice through astrocytic metabotropic glutamate receptor 5. **Glia**, 2021.

SAWCER, S.; HELLENTHAL, G. *et al.* International Multiple Sclerosis Genetics, C.; Wellcome Trust Case Control, C.; Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, 476, n. 7359, p. 214-219, Aug 10 2011.

SCHONROCK, L.; GAWLOWSKI G.; BRUCK W. Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. **Neuroscience Letters**, n. 294, p. 45-48, 2000.

SHAFAROUDI M., ZAREI H., SHAFAROUDI A., KARIMI N., ABEDINI N. The Relationship between Glutamate and Multiple Sclerosis. **IBBJ**, v. 4, n.1, 2018.

SULKOWSKI G., DABROWSKA-BOUTA B., SALIŃSKA E., STRUŻYŃSKA L. Modulation of glutamate transport and receptor binding by glutamate receptor antagonists in eae rat brain. **Plos One**, November, 2014.

SULKOWSKI G., DĄBROWSKA-BOUTA B., CHALIMONIUK M., STRUŻYŃSKA L. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, 15, n. 261, p. 67-76, 2013.

SULKOWSKI G., DABROWSKA-BOUTA B., KWIATKOWSKA-PATZER B., STRUZYŃSKA L. Alterations in glutamate transport and group I metabotropic

glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Folia Neuropathol**, 47, n.4, p. 329-37, 2009.

SRINIVASAN, R.; SAILASUTA, N.; HURD, R.; NELSON, S. *et al.* Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. **Brain**, 128, n. Pt 5, p. 1016-1025, May 2005.

STADELMANN, C.; KERSCHENSTEINER, M.; MISGELD, T.; BRUCK, W. *et al.* BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? **Brain**, 125, n. Pt 1, p. 75-85, Jan 2002.

STOVER, J. F.; PLEINES, U. E.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C.; KOSSMANN, T. *et al.* Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. **Eur J Clin Invest**, 27, n. 12, p. 1038-1043, Dec 1997.

TAFTI, D.; EHSAN M.; XIXIS K. Multiple Sclerosis. **StatPearls Publishing**; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>, Jan, 2022.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 6, n. 10, p. a016295, Sep 4 2014.

TRAYNELIS S., WOLLMUTH L., MCBAIN C., MENNITI F., VANCE K., *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev.** n.62, v.3, p. 405-96, Sep 2010.

TULLMAN, M. J.; OSHINSKY, R. J.; LUBLIN, F. D.; CUTTER, G. R. Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. **Mult Scler**, 10, n. 4, p. 451-454, Aug 2004.

VERCELLINO, M.; MEROLA, A.; PIACENTINO, C.; VOTTA, B. *et al.* Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. **J Neuropathol Exp Neurol**, 66, n. 8, p. 732-739, Aug 2007.

WANG, K.; SONG, F.; FERNANDEZ-ESCOBAR, A.; LUO, G. *et al.* The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. **Am J Med Sci**, 356, n. 6, p. 552-560, Dec 2018.

WALTON C., KING R., RECHTMAN L., KAYE W., LERAY E. *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Mult Scler**. 26, n.14, p.1816-1821, Dec 2020.

WEINER, H. L. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. **J Neurol**, 255 Suppl 1, p. 3-11, Mar 2008.

WERNER, P.; PITT, D.; RAINE, C. S. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. **Ann Neurol**, 50, n. 2, p. 169-180, Aug 2001.

WHEELER, M. A.; CLARK, I. C.; TJON, E. C.; LI, Z. *et al.* MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. **Nature**, 578, n. 7796, p. 593-599, Feb 2020.

YAN, Y.; SHIN, S.; JHA, B. S.; LIU, Q. *et al.* Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. **Stem Cells Transl Med**, 2, n. 11, p. 862-870, Nov 2013.

YI, W.; SCHLUTER, D.; WANG, X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. **Brain Behav Immun**, 80, p. 10-24, Aug 2019.

ZHANG L., PAN J., MAMTILAHUN M., ZHU Y., WANG L., VENKATESH A., SHI R., TU X., JIN K., WANG Y., ZHANG Z., YANG G. Microglia exacerbate white matter injury via complement C3/C3aR pathway after hypoperfusion. **Theranostics** 2020; 10, v.1, p. 74-90, 2020.

ANEXOS**TABELA 1 - Dados referentes à linhagem celular utilizada**

Características da linhagem CF2	
Linhagem celular de origem	Fibroblastos da pele
Características do doador	
Idade	31 anos
Sexo	Masculino
Estado de saúde	Saudável

TABELA 2 - Sequências dos iniciadores utilizados

Gene	Sequência de referência no Genbank (NCBI)	Sequências
TNF-α	NM_000594.3	F - CTGCACTTTGGAGTGATCGG R - TGAGGGTTTGCTACAACATGGG
IL-1β	NM_000576.2	F- CACGATGCACCTGTACGATCA R- GTTGCTCCATATCCTGTCCCT
C3	NM_000064.3	F- CTGCCAGTTTCGAGGTCA R -CGAGCCATCCTCAATCGGAA
IL-10	NM_000572.3	F - TTCCATTCCAAGCCTGACCA R - ATTTGTAGCAGTTAGGAAGCCC
IL-6	NM_000600.5	F- AGAGGCACTGGCAGAAAAC R - TGCAGGAACTGGATCAGGAC
BDNF	NG_011794.1	F- AGTTGGGAGCCTGAAATAGTGG R - AGGATGCTGGTCCAAGTGGT
GNR	NM_002087.3	F -GGCCACTCCTGCATCTTTAC R- GGAGCCATCGACCATAACAC
EAAT1	NG_015890.1	F - GAATGGCGGCGCTAGATAGT R - CCAGGCTTCTACCAGATTTG
RPLP0	NM_001002.3	F- TTAAACCCTGCGTGGCAATC R - ATCTGCTTGGAGCCCACATT
IPO8	NM_006390.3	F- TCCGAACTATTATCGACAGGACC R - GTTCAAAGAGCCGAGCTACAA