

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

Izabella Bárbara Quirino de Lima

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR METABOTRÓPICO DE
GLUTAMATO DO TIPO 5 (MGLUR5) NA RESPOSTA DE ASTRÓCITOS
HUMANOS A UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO**

Belo Horizonte

2024

Izabella Bárbara Quirino de Lima

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR METABOTRÓPICO DE
GLUTAMATO DO TIPO 5 (MGLUR5) NA RESPOSTA DE ASTRÓCITOS
HUMANOS A UM ESTÍMULO INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiola M. Ribeiro

Belo Horizonte

2024

043

Lima, Izabella Bárbara Quirino de.

Investigação do papel do receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (MGLUR5) na resposta de astrócitos humanos a um estímulo inflamatório [manuscrito] / Izabella Bárbara Quirino de Lima. – 2024.

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

Orientadora: Profa . Dra . Fabiola M. Ribeiro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. 3. Astrócitos. 4. Inflamação. 5. Fator de Necrose Tumoral alfa. I. Ribeiro, Fabiola 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@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE IZABELLA BÁRBARA QUIRINO DE LIMA. Aos dezoito dias do mês de setembro de 2024 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e de forma remota utilizando a plataforma “Zoom”, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Investigação do papel do receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5) na resposta de astrócitos humanos a um estímulo inflamatório”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. 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. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Alexander Henning Ulrich (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Marília Zaluar Passos Guimarães (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Rafael Pinto Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ (x) 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, 18 de setembro de 2024.

gov.br

Documento assinado digitalmente

DAWIDSON ASSIS GOMES
Data: 01/10/2024 16:27:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)

Dr. Alexander Henning Ulrich (USP)

Dra. Marília Zaluar Passos Guimarães (UFRJ)

gov.br

Documento assinado digitalmente

MARILIA ZALUAR PASSOS GUIMARAES
Data: 20/09/2024 12:55:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Rafael Pinto Vieira (UFMG)

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente

FABIOLA MARA RIBEIRO
Data: 19/09/2024 09:50:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

gov.br

Documento assinado digitalmente

RAFAEL PINTO VIEIRA
Data: 22/09/2024 07:45:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico este trabalho à minha mãe, Izabel,
e à minha avó, Iracema. Nas palavras
amorosas de minha avó: “vocês são as
cordas do meu coração!”

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fabiola Ribeiro, por todo o conhecimento e experiências compartilhados, pelo incentivo, presença, paciência e, especialmente, pela compreensão e apoio nos momentos em que me encontrei mais vulnerável. Foram muitas coisas inesperadas e fora do meu controle nesses anos e, ao contrário do que minha ansiedade indicava, sempre pude contar com seu suporte e confiança. Muito obrigada!

Às outras pessoas que contribuíram diretamente para este trabalho: ao Dr. Pablo, à Dra. Júlia Fahel, à M.Sc. Juliana Paiva, à Profa. Dra. Aline Miranda e ao Prof. Dr. Antônio Teixeira, por terem ajudado a tornar este trabalho possível.

À banca examinadora, por se disponibilizar para a avaliação do meu trabalho.

Aos membros presentes e passados do Laboratório de Neurobioquímica, por cada momento dividido e todo aprendizado compartilhado. São muitas pessoas que passaram por lá nesses anos, e pude aprender um pouco com cada uma.

Aos membros presentes e passados do Laboratório de RNA de interferência, onde dei meus primeiros passos na ciência. Continuamos compartilhando não somente a bancada, mas também muitas risadas.

Às minhas amigas brilhantes, Ju Brandi, Mel, Nath e Esther. Tive muita sorte de encontrar vocês, pessoas com quem troquei não somente conhecimento científico, mas cujo apoio também foi meu colete salva-vidas em tantos momentos. De coração, obrigada!

À minha família, que tanto amo. À minha mãe e melhor amiga, Izabel, por todo suporte, incentivo e amor incondicionais. Devo tudo que sou à senhora. Obrigada por me apoiar em cada passo do caminho, por estar sempre disposta a me ouvir e por me ajudar a levantar todas as vezes. Ao meu pai, Rafael, por todo suporte aos estudos e trabalho, e que me ensina tanto mesmo sem perceber. Ao meu irmão e melhor amigo, Rafael Júnior, minha dupla. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma acredito! Às minhas tias e tios por estarem sempre presentes, me apoiando. À minha avó Iracema, cuja persistência, sabedoria, resiliência e fé forjaram para nós oportunidades que ela não teve, e ao meu avô Aristides, exemplo de trabalho, força e resistência. Vocês são minha inspiração! À memória da minha avó Didi, cuja lembrança me

fortalece, revigora e reanima a caminhar, e à memória do meu avô Zezé, cujas canções e risada marcante ainda ecoam no meu coração. Amo vocês para sempre!

Às minhas amigas Alice, Carol, Gislaine, Isadora e Marcella. São muitos e muitos anos tornando meus dias mais leves. Obrigada por me amarem mesmo na toca haha!

À Cristal e Safira pela companhia permanente durante as longas horas de estudo e análise de dados, e cujo amor canino incondicional me ancorou em tantos momentos de ansiedade.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha trajetória.

A Deus, seja ser ou força da natureza, seja fruto da mente ou lei da física. Que independente de minha incompreensão ou fé titubeante, permanece presente. Inexorável.

RESUMO

Distúrbios neurológicos são a segunda maior causa de mortes no mundo, tendo sua origem e progressão fortemente relacionadas com processos neuroinflamatórios. O papel dos astrócitos reativos na neuroinflamação tem ganhado crescente relevância, visto que estas células podem influenciar o desfecho de inúmeras condições patológicas de forma benéfica ou prejudicial. Esses astrócitos são capazes de liberar mediadores inflamatórios e afetar a conectividade sináptica, seja pela produção de moléculas sinaptogênicas ou pela eliminação de terminações sinápticas através da fagocitose. Assim, estudar as vias que regulam a atividade dessas células é essencial. O receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5) pode modular a resposta astrocitária ao microambiente, exercendo efeitos opostos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel do mGluR5 na reatividade e na alteração funcional de astrócitos derivados de células tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs) em resposta ao fator de necrose tumoral alfa recombinante (rTNF- α). A inibição do mGluR5 pelo 2-cloro-4-((2,5-dimetil-1-(4-(trifluorometoxi)fenil)-1H-imidazol-4-il)etil)piridina (CTEP) reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e interleucina-6) após 4h de estimulação com rTNF- α , embora esse efeito diminua com o tempo. O CTEP também aumentou a fagocitose de sinaptoneurossomos pelos astrócitos, tanto na ausência quanto na presença de rTNF- α , indicando que o bloqueio de mGluR5 é suficiente para promover a fagocitose de material sináptico. Além disso, tanto a inibição de mGluR5 quanto a estimulação com rTNF- α elevaram a expressão do marcador de reatividade *SERPINA3* e reduziram a expressão de moléculas sinaptogênicas. Esses dados sugerem que o mGluR5 desempenha um papel complexo nos astrócitos, já que seu bloqueio tem efeitos potencialmente protetores ou prejudiciais em contextos inflamatórios.

Palavras-chave: mGluR5; astrócitos reativos; neuroinflamação; TNF- α .

ABSTRACT

Neurological disorders are the second leading cause of death worldwide, with their origin and progression strongly linked to neuroinflammatory processes. The role of reactive astrocytes in neuroinflammation has gained increasing relevance, as these cells can influence the outcome of numerous pathologies in either a beneficial or detrimental manner. These astrocytes can release inflammatory mediators and affect synaptic connectivity, either by producing synaptogenic molecules or by eliminating synaptic terminals through phagocytosis. Thus, studying the pathways that regulate the activity of these cells is essential. The metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) can modulate the astrocytic response to the microenvironment, exerting opposite effects. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of mGluR5 in the reactivity and functional alteration of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived astrocytes in response to recombinant tumour necrosis factor alpha (rTNF- α). Inhibition of mGluR5 by 2-chloro-4-((2,5-dimethyl-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1H-imidazol-4-yl)ethynyl)pyridine (CTEP) reduced the secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and interleukin-6) after 4 hours of stimulation with rTNF- α , although this effect diminishes over time. CTEP also increased the phagocytosis of synaptoneurosomes by astrocytes, both in the absence and presence of rTNF- α , indicating that blocking mGluR5 is sufficient to promote the phagocytosis of synaptic material. Additionally, both inhibition of mGluR5 and stimulation with rTNF- α elevated the expression of the reactivity marker *SERPINA3* and reduced the expression of synaptogenic molecules. These data suggest that mGluR5 plays a complex role in astrocytes, as its blockade can have potentially protective or harmful effects in inflammatory contexts.

Keywords: mGluR5; reactive astrocytes; neuroinflammation; TNF- α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Possíveis efeitos da reatividade astrocitária induzida por estímulos patológicos	22
Figura 2. Vias de sinalização do mGluR5	24
Figura 3: Desenho experimental	28
Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR	31
Figura 4. Caracterização de astrócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs)	37
Figura 5. Astrócitos derivados de hiPSCs expressam mGluR5 e mGluR1.....	38
Figura 6. CTEP reduz a expressão de fatores inflamatórios induzida por rTNF- α	39
Figura 7. CTEP modula os níveis de mRNA de mediadores inflamatórios em astrócitos estimulados com rTNF- α	40
Figura 8. mGluR5 modula a expressão do marcador geral de astrócitos reativos <i>SERPINA3</i>	42
Figura 9. Expressão de marcadores de reatividade por astrócitos derivados de hiPSCs.....	43
Figura 10. Sinaptoneurossomos isolados do cérebro de camundongos são enriquecidos em marcadores pré e pós-sinápticos	45
Figura 11. Astrócitos derivados de hiPSCs são capazes de fagocitar sinaptoneurossomos	45
Figura 12. CTEP e rTNF- α aumentam o índice de fagocitose de astrócitos derivados de hiPSCs	46
Figura 13. rTNF- α diminui a expressão de MERTK em astrócitos derivados de hiPSCs.....	47
Figura 14. CTEP e rTNF- α podem modular os níveis de mRNA de receptores de fagocitose em astrócitos	48
Figura 15. CTEP e rTNF- α diminuem a expressão de moléculas sinaptogênicas	50
Figura 16. Efeitos do CTEP em astrócitos derivados de hiPSCs sob condição não inflamatória e pró-inflamatória	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius
Aβ	Peptídeo Beta-amiloide
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AXL	Receptor Tirosina Quinase AXL
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BSA	Albumina de Soro Bovino
C1q	Componente 1q do Complemento
C3	Complemento C3
C4	Complemento C4
CaN	Calcineurina
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CREB	Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo a AMPc
CTEP	2-cloro-4-((2,5-dimetil-1-(4-(trifluorometoxi)fenil)-1H-imidazol-4-il)etnil)piridina
DA	Doença de Alzheimer
DAG	1,2,-diacilglicerol
DHPG	(S)-3,5-Dihidroxiphenilglicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
FKBP5	FKBP prolil Isomerase 5
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GBP2	Proteína de Ligação ao Guanilato 2
GPC-4	Glipican-4
hiPSCs	Células Tronco de Pluripotência Induzida Humanas

IF	Índice de Fagocitose
IL-1 β	Interleucina-1 Beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12p70	Interleucina-12p70
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
JNK	C-Jun N-terminal quinase
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP1	Proteína 1 Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MCP-1	Proteína Químioatraente de Monócitos
MERTK	Proto-oncogene MER, tirosina quinase
MEGF10	Múltiplos domínios semelhantes a EGF 10
mGluRs	Receptores Metabotrópicos de Glutamato
mGluR5	Receptor Metabotrópico de Glutamato do tipo 5
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MMA	Meio de Maturação de Astrócitos
MPEP	2-metil-6(feniletinil) piridina
mRNA	RNA mensageiro
NAM	Modulador Alostérico Negativo
NFATC3	Fator Nuclear de Células T Ativadas 3
NFATC4	Fator Nuclear de Células T Ativadas 4
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NSCs	Células-Tronco Neurais
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PFA	Paraformaldeído
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína Quinase C
PLD	Fosfolipase D
qPCR	PCR quantitativo
RE	Retículo Endoplasmático

rTNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa Recombinante
S100A10	Proteína A10 de Ligação ao Cálcio S100
SERPINA3	Membro 3 da Família Serpina A
SERPING1	Membro 1 da Família Serpina G
SFB	Soro Fetal Bovino
SIB	Tampão de Isolamento de Sinaptoneurosomos
SNC	Sistema Nervoso Central
SPARCL1	Proteína 1 Semelhante à SPARC
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral 1
TNFR2	Receptor do fator de necrose tumoral 2
TSP1	Trombospondina-1
VCAM-1	Molécula 1 de Adesão Celular Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Da inflamação à disfunção: neuroinflamação no epicentro dos distúrbios neurológicos	16
1.1.1 Estrelas da neuroinflamação: a influência multifacetada dos astrócitos..	20
1.1.2 Lendo o ambiente: o papel do mGluR5 na resposta astrocitária	23
1.2 Modelo experimental	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 Cultura de hiPSCs	29
3.2 Diferenciação de astrócitos humanos	29
3.3 Tratamento das células	30
3.4 RT-PCR quantitativo	30
3.5 Imunofluorescência	32
3.6 Isolamento e marcação de sinaptoneurossomos	33
3.7 Ensaio de fagocitose de sinaptoneurossomos	34
3.8 <i>Immunoblotting</i>	35
3.9 Quantificação de citocinas	35
3.10 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 A inibição do mGluR5 é capaz de modular a resposta inflamatória induzida por rTNF- α em astrócitos humanos	37
4.2 A inibição do mGluR5 modula a expressão do marcador de astrócitos reativos <i>SERPINA3</i> em astrócitos humanos	41
4.3 A inibição do mGluR5 aumenta a fagocitose de material sináptico em astrócitos humanos	44
4.4 O tratamento com rTNF- α e a inibição do mGluR5 reduzem a expressão de moléculas sinaptogênicas em astrócitos humanos	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

8. PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS DURANTE O DOUTORADO	74
8.1 Artigos publicados	74
8.2 Resumos publicados em anais de congresso	74
9. ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

Doenças neurológicas representam o principal grupo de distúrbios causadores de deficiências e são a segunda maior causa de óbitos no mundo (Feigin *et al.*, 2017; Feigin *et al.*, 2019). Nas Américas, apenas em 2019, mais de meio milhão de pessoas faleceram em decorrência de algum distúrbio neurológico (P.A.H.O, 2021). De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde, o Brasil é o país com o somatório mais alto de anos de convivência com deficiências resultantes dessas doenças, em toda a América Latina (P.A.H.O, 2021).

O número absoluto de pessoas com deficiência e de óbitos ocasionados por distúrbios neurológicos tem crescido acentuadamente ao longo dos anos (Feigin *et al.*, 2020). Com o envelhecimento populacional, um contingente crescente de indivíduos alcançará idades em que doenças neurológicas são mais prevalentes, aumentando o impacto econômico e social desses distúrbios (Feigin *et al.*, 2019; Feigin *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2022). Portanto, a busca por ferramentas de prevenção, alívio e tratamento dessas condições patológicas assume caráter imperativo.

Dentre as ações possíveis para mitigar o impacto dos distúrbios neurológicos, um dos caminhos mais promissores reside no investimento em pesquisas para a compreensão dos mecanismos etiopatogênicos subjacentes a essas condições (Feigin *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2021; Owolabi *et al.*, 2023). Nesse contexto, a pesquisa com foco na neuroimunologia destaca-se, já que um fator de grande preponderância na origem e desenvolvimento de virtualmente todos os distúrbios neurológicos é a neuroinflamação (Brambilla, 2019b; Gilhus; Deuschl, 2019; Nutma *et al.*, 2019).

1.1 Da inflamação à disfunção: neuroinflamação no epicentro dos distúrbios neurológicos

A neuroinflamação é um mecanismo de defesa desencadeado em resposta a mudanças anormais no microambiente do sistema nervoso central (SNC) (Disabato *et al.*, 2016; Brambilla, 2019b; Mishra *et al.*, 2021). Deste processo participam diversos tipos celulares que agem coordenadamente com o propósito fundamental de restaurar a homeostase e preservar a integridade do SNC (Brambilla, 2019b; Mishra *et al.*, 2021). Contudo, dada a natureza intrincada desse fenômeno, não é surpreendente que até mesmo um desequilíbrio mínimo possa ocasionar processos prejudiciais à

recuperação do SNC, contrariando seu propósito original (Brambilla, 2019b). Neste cenário, torna-se evidente o envolvimento de mecanismos neuroinflamatórios em uma abrangente variedade de distúrbios neurológicos. Essa associação compreende desde doenças canonicamente inflamatórias como a esclerose múltipla (EM) (Brambilla, 2019a), até distúrbios que não são tradicionalmente interpretados como resultados diretos da neuroinflamação, a exemplo da doença de Alzheimer (DA) (Thakur *et al.*, 2023), acidente vascular cerebral (AVC) (Lambertsen *et al.*, 2019), epilepsia (Li *et al.*, 2023) e doença de Parkinson (DP) (Gilhus; Deuschl, 2019; Tansey *et al.*, 2022).

Para compreender como um mecanismo de proteção e promoção da homeostase pode se tornar um fator prejudicial, impulsionando uma variedade significativa de doenças, é necessário conhecer algumas atividades intrínsecas que lhe conferem valor funcional. Um papel da neuroinflamação, mais classicamente associado com o sistema imune, é a defesa contra patógenos (Klein; Hunter, 2017). Embora crucial para evitar a persistência microbiana, a resposta contra patógenos pode ser danosa quando desregulada, levando à neurotoxicidade (Klein *et al.*, 2017; Klein; Hunter, 2017). Apesar de a neuroinflamação ter recebido uma conotação majoritariamente negativa ao longo do tempo, diversos estudos demonstram sua participação em outros processos que promovem a recuperação do SNC, como a neurogênese (Imitola *et al.*, 2004; Ziv *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017), a regeneração axonal (Prewitt *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 2006; Barrette *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009; Torres-Espin *et al.*, 2018) e a remielinização (Kotter *et al.*, 2001; Lampron *et al.*, 2015; Russo; McGavern, 2016; Yuan *et al.*, 2017).

Um dos aspectos mais proeminentes da neuroinflamação é a elevação da produção de citocinas, que são mediadores essenciais para a coordenação da resposta imune. Citocinas estão no centro das disfunções neuroinflamatórias, estando envolvidas tanto em processos de restauração da homeostase, quanto na exacerbação dos danos em diversos distúrbios (Liberto *et al.*, 2004; Goverman, 2009; Chamorro *et al.*, 2012; Becher *et al.*, 2017; Liddelow *et al.*, 2017; Shinozaki *et al.*, 2017). Na EM, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias oriundas de células da periferia alimentam a cascata inflamatória no SNC, causando danos teciduais (Goverman, 2009; Becher *et al.*, 2017; Palle *et al.*, 2017). Já em doenças como a DA, a elevação na produção de citocinas, em resposta a alterações no microambiente do SNC, pode ser importante para a promoção de reparo tecidual e para a eliminação de

agregados proteicos. Contudo, a produção crônica de citocinas está relacionada com a perda da função normal dos tecidos (He *et al.*, 2007; Chakrabarty *et al.*, 2010; Chakrabarty *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Becher *et al.*, 2017; Leng; Edison, 2021). Dessa forma, a variedade de efeitos desencadeados por esses mediadores pode ser explicada pelo contexto em que são produzidos, bem como pela intensidade e duração de sua produção. Ademais, a natureza pleiotrópica das citocinas permite que uma mesma molécula gere efeitos distintos, e até mesmo opostos, em diferentes células (Becher *et al.*, 2017).

Uma das citocinas mais relevantes em contextos patológicos é o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que está envolvido em diversos distúrbios neurológicos (Barone *et al.*, 1997; New *et al.*, 1998; Janelins *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2022; Gonzalez Caldito, 2023). Os efeitos do TNF- α são exercidos por meio dos receptores do fator de necrose tumoral 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2), cuja sinalização pode culminar em processos antagônicos ou complementares, dependendo do contexto (Aggarwal, 2003). O TNFR1 é constitutivamente expresso na maioria dos tipos celulares (Hsu *et al.*, 1995; Gough; Myles, 2020) e sua ativação inicia cascatas de sinalização que podem promover morte ou sobrevivência celular, bem como respostas pro-inflamatórias (Gough; Myles, 2020). Esses efeitos podem ser mediados por diversas vias, como as das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo as c-Jun N-terminal quinases (JNKs) e as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), bem como pelo complexo de proteínas ativadoras-1 (AP-1) e pelo fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Wu; Zhou, 2010; Atretkhany *et al.*, 2020; Gough; Myles, 2020). Por outro lado, o TNFR2 é expresso de forma mais restrita e não possui o domínio de morte celular encontrado no TNFR1 (Medler; Wajant, 2019; Gough; Myles, 2020). A ativação de TNFR2 está associada com efeitos proinflamatórios, anti-inflamatórios e citoprotetores mediados pela ativação de vias como as das fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) e NF- κ B (Fontaine *et al.*, 2002; McCoy; Tansey, 2008; Veroni *et al.*, 2010; Medler; Wajant, 2019). É interessante observar que tanto TNFR1 quanto TNFR2 podem ativar as mesmas vias, como a via de NF- κ B e as MAPKs, incluindo JNK e ERK. Os efeitos gerados por TNF- α são, então, uma resultante da interação entre a complexa sinalização intracelular iniciada por cada um de seus receptores (Gough; Myles, 2020). A sinalização pleiotrópica do TNF- α o torna um notável representante da diversidade funcional das citocinas.

Mediadores imunes, como o TNF- α , podem ser produzidos por diferentes tipos celulares, destacando-se as micróglia e os astrócitos (Yang; Zhou, 2019).

Micróglia e astrócitos são as principais células fagocíticas do SNC, o que torna estas células centrais no processo neuroinflamatório (Galloway *et al.*, 2019; Kono *et al.*, 2021). A fagocitose é um evento frequentemente vinculado com a neuroinflamação. Além de participar da eliminação de patógenos, a fagocitose também é crucial para a remoção de debris celulares (Neumann *et al.*, 2009), agregados proteicos (Koistinaho *et al.*, 2004) e para a remodelação sináptica (Paolicelli *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2013). A remoção de debris celulares é fundamental para processos reparadores como a remielinização (Cantoni *et al.*, 2015; Lampron *et al.*, 2015) e a regeneração axonal (Barrette *et al.*, 2008; Rajbhandari *et al.*, 2014). Já a fagocitose de agregados proteicos é de especial relevância em proteopatias como a DA, onde estudos indicam que o desequilíbrio entre a produção e a eliminação do peptídeo beta-amiloide (A β) resulta em sua acumulação, gerando toxicidade (Mawuenyega *et al.*, 2010; Hampel *et al.*, 2021). Em contrapartida, a exacerbação da fagocitose pode acarretar prejuízos, como o excesso de poda sináptica, ocasionando um desbalanço no *turnover* de sinapses e perda sináptica, o que, conseqüentemente, prejudica o funcionamento neuronal, culminando em déficit cognitivo (Cardozo *et al.*, 2019). Este fenômeno pode ser observado em doenças como a DA e a esquizofrenia (Cardozo *et al.*, 2019).

Desse modo, nota-se que a neuroinflamação é um processo altamente complexo que não pode ser simplesmente categorizado como prejudicial. Suas diversas atuações, tanto na etiopatogenia de distúrbios neurológicos, quanto como potencial instrumento de mitigação desses mesmos distúrbios, devem ser igualmente consideradas. Espera-se, portanto, que as células que orquestram o processo neuroinflamatório, sendo as principais micróglia e astrócitos, exibam uma ambivalência funcional similar (Yang; Zhou, 2019). Em uma tentativa de distinguir e elucidar essa ambivalência, fenótipos de micróglia com ações opostas receberam uma classificação dicotômica baseada em uma categorização já utilizada no caso de macrófagos (Mantovani *et al.*, 2002). Dessa maneira, micróglia M1 com um fenótipo pró-inflamatório, seriam neurotóxicas, enquanto micróglia M2 com fenótipo anti-inflamatório gerariam neuroproteção (Henkel *et al.*, 2009). De acordo com essa classificação, a transição para estes fenótipos polarizados é dependente do tipo de estímulo recebido por estas células (Loane; Kumar, 2016). Apesar das micróglia

serem consideradas as principais células mediadoras do processo neuroinflamatório, os astrócitos têm sido cada vez mais reconhecidos por seu papel no início, sustentação e propagação de respostas neuroinflamatórias (Lee *et al.*, 2023).

1.1.1 Estrelas da neuroinflamação: a influência multifacetada dos astrócitos

Astrócitos são uma população celular altamente heterogênea, desempenhando uma variedade de funções importantes para a manutenção da homeostasia do SNC (Verkhratsky; Nedergaard, 2018). Em condições não patológicas os subtipos de astrócitos manifestam diversos perfis genômicos e funcionais, que podem ser determinados por sua localização e interação com outras células do SNC (Rouach *et al.*, 2008; Ben Haim; Rowitch, 2017; Hasel *et al.*, 2017; Saunders *et al.*, 2018; Zeisel *et al.*, 2018; Batiuk *et al.*, 2020; Bayraktar *et al.*, 2020). Os astrócitos fornecem suporte metabólico aos neurônios e interagem com vasos sanguíneos, constituindo a barreira hematoencefálica e regulando o fluxo sanguíneo local (Rouach *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2011; Verkhratsky; Nedergaard, 2018; Marina *et al.*, 2020). Ademais, estas células são capazes de modular a atividade sináptica e a conectividade neuronal através de processos como a liberação de gliotransmissores, a fagocitose de sinapses, a produção de moléculas sinaptogênicas e o tamponamento de glutamato (Anderson; Swanson, 2000; Christopherson *et al.*, 2005; Eroglu *et al.*, 2009; Perea *et al.*, 2009; Allen *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2021). Nos distúrbios neurológicos, essas e outras funções podem ser alteradas (Merlini *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2017; Polyzos *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2021; Endo *et al.*, 2022).

Uma das maneiras com que os astrócitos podem responder a estímulos patológicos, sejam eles agudos ou crônicos, consiste em um processo denominado astrogliose reativa (Escartin *et al.*, 2021; Verkhratsky *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023). Nesse processo, estas células passam por uma remodelação de sua morfologia, expressão, metabolismo e função. Notavelmente, essa modulação da resposta astrocitária pode resultar em fenótipos celulares com efeitos por vezes opostos e que podem contribuir para suprimir ou exacerbar processos neuroinflamatórios, afetando o desfecho de diferentes condições patológicas de forma benéfica ou prejudicial (figura 1) (Escartin *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023). Astrócitos reativos podem, por exemplo, facilitar a infiltração celular e promover a neuroinflamação na EM e no modelo de encefalomielite autoimune experimental (Kim *et al.*, 2014; Prins *et al.*, 2014;

Wheeler *et al.*, 2020). Adicionalmente, estas células podem secretar substâncias neurotóxicas, causando morte neuronal em modelos de DA, AVC e lesão axonal aguda (Guttenplan *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Mi *et al.*, 2023). Em oposição, os astrócitos reativos podem restringir a inflamação ao formar barreiras ao redor de áreas lesionadas (Sofroniew, 2015). Há ainda, indícios de que a astrogliose reativa é importante para a neurogênese e sobrevivência neuronal em um modelo de DP (L'episcopo *et al.*, 2011) e para a produção de moléculas que auxiliam a regeneração axonal (Anderson *et al.*, 2016). Além disso, quase todos os astrócitos da matéria cinzenta interagem com pelo menos um vaso sanguíneo (Hosli *et al.*, 2022), fazendo com que estas células possam responder não somente a alterações no microambiente do SNC, mas também a moléculas oriundas da circulação (Rothhammer *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2023). Astrócitos reativos também possuem a capacidade de afetar a atividade de outras células relevantes para o processo neuroinflamatório. A saber, os astrócitos podem modular a resposta transcricional de micróglias, suprimindo sua ativação ou induzindo a adoção de um perfil inflamatório, promovendo ou limitando alterações patológicas, a depender do contexto analisado (Kim *et al.*, 2011; Mayo *et al.*, 2014; Jo *et al.*, 2017; Wheeler *et al.*, 2019; Mcalpine *et al.*, 2021; Kiss *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023; Cameron *et al.*, 2024).

A influência multifacetada dos astrócitos reativos em contextos patológicos suscitou a tentativa de classificação de seus diferentes estados de reatividade. O trabalho de Liddelow *et al.* (2017) propõe a classificação dos padrões de reatividade astrocitária em dois fenótipos distintos. Em consonância com a abordagem de categorização de micróglias em M1 e M2 (HENKEL; BEERS; ZHAO; APPEL, 2009), essa classificação denomina astrócitos com perfil neurotóxico e inflamatório como A1, e astrócitos com perfil reparador e anti-inflamatório como A2. Esses dois subtipos também diferem quanto ao estímulo capaz de originá-los. Astrócitos do tipo A1 são induzidos por estímulos inflamatórios tais como a administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), já astrócitos do tipo A2 são induzidos por isquemia (Liddelow *et al.*, 2017). Embora essa diferenciação seja útil para ilustrar a ambivalência funcional dos astrócitos reativos, outros autores contestam essa classificação. Análises de sequenciamento de RNA em diferentes contextos patológicos indicam a existência de múltiplos perfis transcricionais que não se encaixam na caracterização A1/A2 (Escartin *et al.*, 2021).

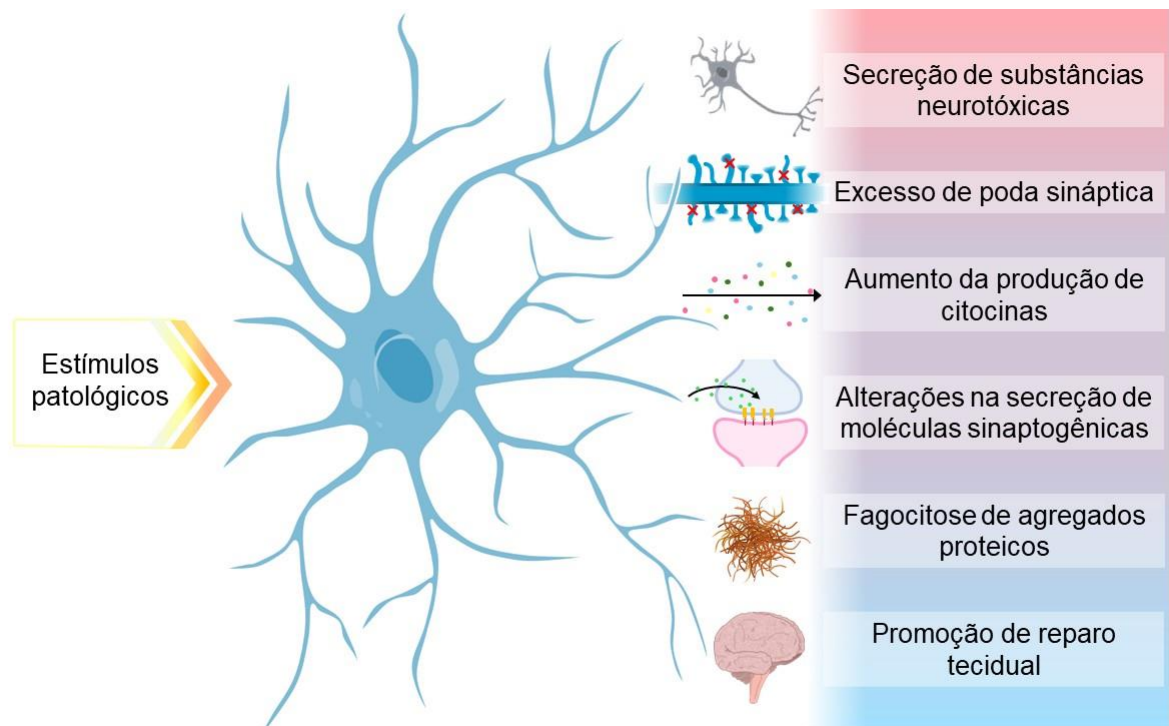


Figura 1. Possíveis efeitos da reatividade astrocitária induzida por estímulos patológicos. Alterações anormais no microambiente do sistema nervoso central (SNC) podem desencadear a reatividade astrocitária. Esta figura ilustra os efeitos potenciais da reatividade: processos benéficos (em azul), como a promoção do reparo tecidual, e a fagocitose de agregados proteicos; e processos prejudiciais (em vermelho), como a secreção de substâncias neurotóxicas e o excesso de poda sináptica. Além disso, existem respostas astrocitárias que, dependendo do contexto, podem contribuir tanto para a manutenção quanto para a perturbação da homeostase do SNC (em roxo). Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Considerando a relevância dos astrócitos reativos para o processo neuroinflamatório e sua influência no desfecho de múltiplos distúrbios, vias de sinalização envolvidas no controle da atividade dessas células podem ser alvos terapêuticos promissores para prevenir ou mitigar a adoção de perfis neurotóxicos. Receptores expressos em astrócitos estão envolvidos na detecção e resposta astrogliar às alterações no microambiente do SNC (D'ascenzo *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2016; Rothhammer *et al.*, 2016; Shinozaki *et al.*, 2017; Verkhratsky; Nedergaard, 2018). Neste contexto, o receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5) apresenta-se como um importante regulador de diversos fatores de transcrição, sendo um notável candidato para a modulação da atividade astrocitária (Kumar *et al.*, 2012; Wang; Zhuo, 2012; Abd-Elrahman; Ferguson, 2019; De Souza *et al.*, 2020).

1.1.2 Lendo o ambiente: o papel do mGluR5 na resposta astrocitária

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos (Ribeiro *et al.*, 2017). Os receptores de glutamato podem ser divididos em ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos incluem os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDARs), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e cainato, sendo canais iônicos cuja ligação do glutamato permite o influxo de íons para o interior das células (Dingledine *et al.*, 1999). Já os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são receptores acoplados à proteína G, sendo divididos em três grupos, de acordo com suas vias de sinalização intracelular e similaridade de sequência. No grupo 1 estão os receptores mGluR1 e mGluR5, no grupo 2 encontram-se os receptores mGluR2 e mGluR3, enquanto mGluR4, 6, 7 e 8 fazem parte do grupo 3 (Nakanishi, 1994; Pin; Duvoisin, 1995; Conn; Pin, 1997; Gerber *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2017).

O mGluR5 é amplamente expresso em diversas regiões do SNC, tanto em neurônios, quanto em células da glia (Balazs *et al.*, 1997; Kerner *et al.*, 1997). Como ilustrado na figura 2, a ativação do mGluR5 faz com que a proteína $G\alpha_{q/11}$ ative a fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), gerando 1,2 diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). A ligação de IP_3 ao seu receptor presente no retículo endoplasmático provoca a liberação de Ca^{2+} , o qual coopera com DAG, levando à ativação da proteína quinase C (PKC) (revisado por Ribeiro *et al.*, 2017). Essa via culmina na ativação de proteínas essenciais para a regulação dos mais diversos processos celulares, como a calcineurina, e na modificação da atividade de receptores como o NMDAR (Lu *et al.*, 1999; Benquet *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2023). Em astrócitos, mGluR5 também pode ativar vias não canônicas, como a via das MAPKs e a fosfolipase D (PLD) (Peavy; Conn, 1998; Servitja *et al.*, 1999). Nessas células, a sinalização via mGluR5 também pode modular outros processos essenciais para a neurotransmissão, como o ciclo glutamato/GABA-glutamina (Dong *et al.*, 2018).

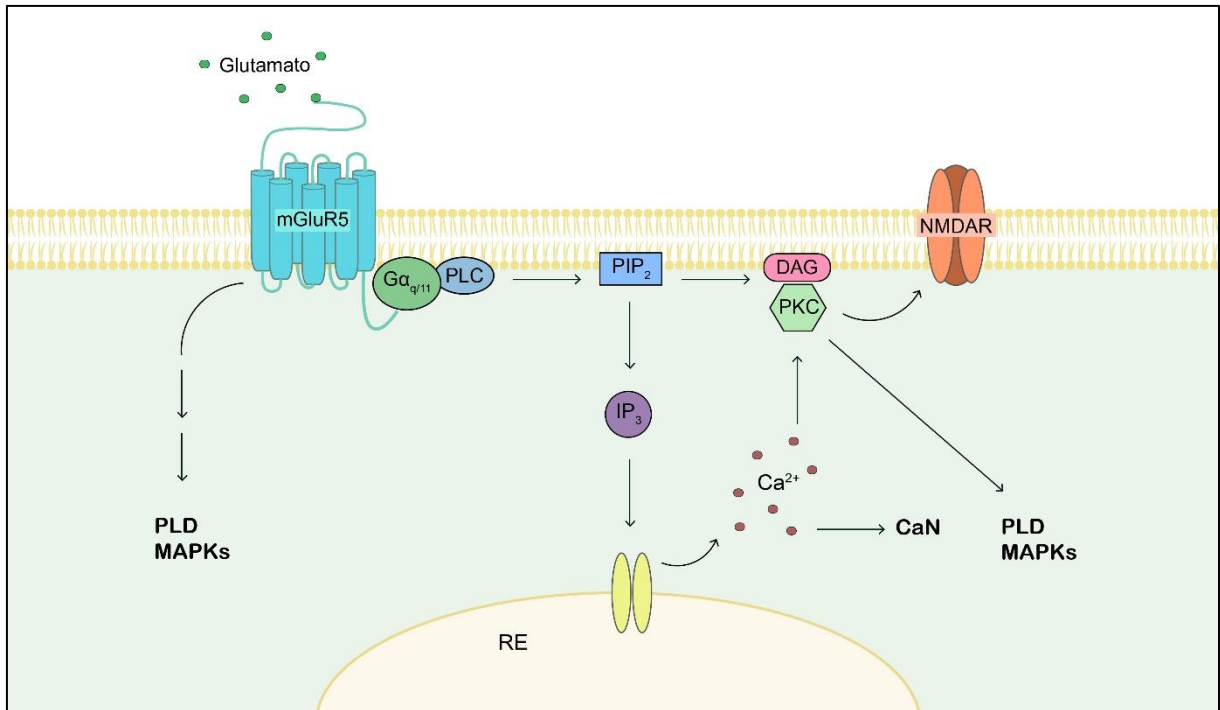


Figura 2: Vias de sinalização do mGluR5. A ilustração apresenta uma síntese dos principais efeitos da ligação de glutamato no receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5). A ativação de mGluR5 aciona a proteína $G\alpha_{q/11}$, que ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), gerando 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 se liga a receptores no retículo endoplasmático (RE), induzindo a liberação de Ca^{2+} , que em conjunto com DAG, ativa a proteína quinase C (PKC). O aumento de Ca^{2+} também leva à ativação de proteínas como a calcineurina que participa de vários processos celulares. Já a PKC medeia a regulação da atividade de receptores como o NMDAR e provoca a ativação de diversas proteínas como a fosfolipase D (PLD) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A PLD e as MAPKs também podem ser ativadas por outras vias de sinalização não canônicas. Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Embora a expressão do mGluR5 em astrócitos decline após o nascimento (Cai *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2013), estudos têm demonstrado uma elevação da expressão desse receptor nessas células em vários distúrbios neurológicos, como esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Aronica *et al.*, 2001), EM (Geurts *et al.*, 2003) e DA (Shrivastava *et al.*, 2013), sugerindo um papel relevante do mGluR5 na resposta astrocitária a contextos patológicos. Em micróglias, a ativação do mGluR5 produz um efeito anti-inflamatório, diminuindo a expressão do TNF- α e a geração de espécies reativas de oxigênio (Byrnes *et al.*, 2009; Loane *et al.*, 2009). No entanto, o papel do mGluR5 em astrócitos no contexto neuroinflamatório é controverso. Alguns estudos indicam que a ativação do mGluR5 astrogliar após uma lesão protege células próximas, desencadeando a liberação de fatores de crescimento e moléculas sinaptogênicas (Fulmer *et al.*, 2014; Saitta *et al.*, 2021), enquanto outro sugere que a

ativação do mGluR5 é prejudicial, pois leva à produção exacerbada de mediadores inflamatórios (Shah *et al.*, 2012). Especificamente, foi demonstrado que a inibição do mGluR5 pelo 2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP) impede o aumento de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) induzido por metanfetamina em uma linhagem celular de astrócitos humanos (Shah *et al.*, 2012). De forma contrária, em astrócitos murinos, há indícios de que a ativação do mGluR5 pode suprimir a elevação na expressão da interleucina-1 beta (IL-1 β) e da proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) induzida por um estímulo inflamatório (Kim, H. *et al.*, 2016). Além disso, a ativação do mGluR5 pela (S)-3,5-Dihidroxiphenilglicina (DHPG) não tem efeito na expressão de IL-6 induzida por IL-1 β em astrócitos humanos (Aronica *et al.*, 2005). Em virtude do aumento da expressão do mGluR5 em astrócitos em diferentes condições patológicas e, considerando as evidências de que o mGluR5 é capaz de alterar a produção de citocinas inflamatórias por estas células, nossa hipótese é de que o bloqueio do mGluR5 modula a astrogliose reativa, provocando alterações funcionais em resposta a um ambiente pró-inflamatório. Para testar essa hipótese, nós utilizamos astrócitos derivados de células tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs) estimulados com TNF- α recombinante (rTNF- α).

1.2 Modelo experimental

Embora modelos murinos sejam úteis por apresentar as interações complexas de um organismo, ausentes em modelos *in vitro*, existem diferenças significativas entre astrócitos humanos e murinos. Astrócitos humanos apresentam uma morfologia mais complexa, sendo maiores e mais ramificados (Oberheim *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013). Estas células demonstram também consideráveis diferenças transcricionais e funcionais (Han *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2021). Dentre essas diferenças, foi demonstrado que astrócitos apresentam perfis de expressão gênica espécie-específicos quando expostos ao TNF- α , sendo que astrócitos humanos mostram uma resposta imune mais robusta em comparação aos astrócitos murinos (Li *et al.*, 2021). Desse modo, a utilização de modelos constituídos por células humanas, é essencial para ajudar a suplantar a frequente inabilidade de transpor resultados obtidos em modelos animais para o contexto clínico (Li *et al.*, 2021; Patani *et al.*, 2023). Embora astrócitos derivados de tecido *post-mortem* humano sejam utilizados, eles apresentam viabilidade funcional prejudicada (Nolle *et al.*, 2021; Patani

et al., 2023). Neste cenário, astrócitos derivados de hiPSCs têm se mostrado uma ferramenta útil para preencher essa lacuna, apresentando características moleculares e funcionais típicas desse tipo celular (Soubannier *et al.*, 2020). Ademais, estas células demonstram a habilidade de responder a estímulos inflamatórios com alterações associadas à astrogliose reativa (Soubannier *et al.*, 2020; Trindade *et al.*, 2020).

Neste trabalho, optamos por estimular astrócitos derivados de hiPSCs com rTNF- α devido à relevância dessa citocina nos mecanismos inflamatórios envolvidos em diversos distúrbios neurológicos (Barone *et al.*, 1997; New *et al.*, 1998; Janelins *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2022; Gonzalez Caldito, 2023). Para modificar a atividade do mGluR5, utilizamos o modulador alostérico negativo (NAM) 2-cloro-4-((2,5-dimetil-1-(4-(trifluorometoxi)fenil)-1H-imidazol-4-il)etil)piridina (CTEP) e o agonista DHPG. CTEP é um fármaco potente e altamente específico que atua como agonista inverso do mGluR5, bloqueando sua atividade constitutiva (Lindemann *et al.*, 2011). Já o DHPG é um agonista seletivo para mGluR 1/5 que, ao contrário do agonista seletivo do mGluR5, 2-Cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG), apresenta alta potência (Ito *et al.*, 1992; Balazs *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar o papel do mGluR5 na reatividade e na alteração funcional de astrócitos derivados de hiPSCs em resposta ao rTNF- α .

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a produção de citocinas inflamatórias em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com rTNF- α ou veículo e tratados com CTEP, DHPG ou veículo;
- Investigar a expressão de marcadores de reatividade em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com rTNF- α ou veículo e tratados com CTEP, DHPG ou veículo;
- Investigar a existência de alterações no índice de fagocitose de sinaptoneurossomos associadas à modulação de mGluR5 em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com rTNF- α ou veículo e tratados com CTEP, DHPG ou veículo.
- Investigar a existência de alterações na produção de moléculas sinaptogênicas associadas à modulação de mGluR5 em astrócitos derivados de hiPSCs estimulados com rTNF- α ou veículo e tratados com CTEP, DHPG ou veículo.

3. METODOLOGIA

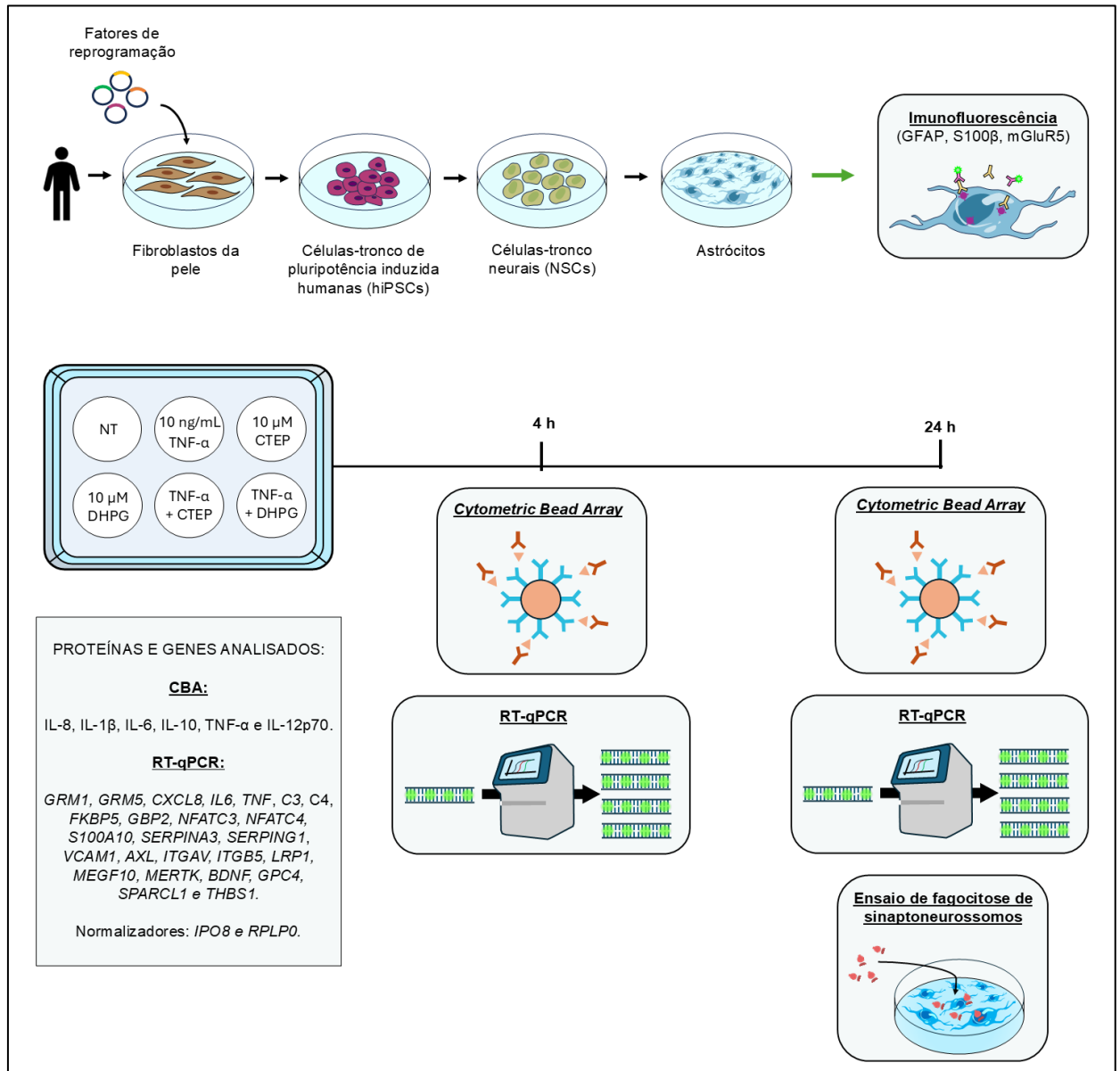


Figura 3: Desenho experimental. A ilustração apresenta um desenho esquemático dos experimentos realizados neste trabalho. Astrócitos diferenciados a partir de células tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs) foram caracterizados pela análise de marcadores específicos de astrócitos. Em seguida, estas células foram tratadas com veículo (NT), 10 μM de CTEP ou 10 μM de DHPG e estimuladas com 10 ng/mL de rTNF-α por 4h ou 24h. Nos tempos de 4h e 24h, foram analisados os níveis proteicos de diversos mediadores imunes, além dos níveis de mRNA de citocinas, marcadores de reatividade, receptores astrocíticos envolvidos na fagocitose e moléculas sinaptogênicas. Adicionalmente, no tempo de 24h, foi realizado um ensaio de fagocitose de sinaptoneurossomos. Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

3.1 Cultura de hiPSCs

A linhagem celular 7889SA foi obtida da *New York Stem Cell Foundation* (NYSCF ID CO0002-01-SV-003) e descrita anteriormente (Kwart *et al.*, 2019). As hiPSCs foram mantidas em placas de 6 poços revestidas com Geltrex (Gibco, cat n. A1413302) em meio StemFlex (Gibco, cat n. A3349301). Ao atingir 80-90% de confluência, as células foram incubadas por 3-4 min. em 500 μ M EDTA (Sigma, cat n. EDS) em tampão fosfato-salino (PBS), dissociadas, e colocadas em novas placas de 6 poços revestidas com Geltrex para expansão. O meio foi trocado a cada 48 h.

3.2 Diferenciação de astrócitos humanos

Astrócitos foram diferenciados a partir das hiPSCs como descrito previamente (Trindade *et al.*, 2020). As hiPSCs foram dissociadas em células únicas usando a acutase StemPro (Gibco, cat n. A1110501) e foram passadas para placas de 6 poços revestidas com Geltrex a uma densidade de 3×10^4 células/cm² em meio StemFlex suplementado com 10 μ M de inibidor da quinase associada a Rho (ROCK) Thiazovivin (Sigma Aldrich, cat n. SML1045). Para iniciar a diferenciação (dia 0), o meio foi trocado por meio de indução neural de células-tronco pluripotentes contendo meio neurobasal (Gibco, cat n. 21103-049), suplemento de indução neural (Gibco, cat n. A1647701) e 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Gibco, cat n. 15410-122). A troca de meio foi realizada a cada 48 horas. No dia 7, as células-tronco neurais (NSCs) foram dissociadas com Accutase e transferidas a uma densidade de 1×10^5 células/cm² para placas de 60 mm revestidas com Geltrex em meio de expansão de NSCs contendo 50% de DMEM/F12 Avançado (Gibco, cat n. 12634010), 50% de meio neurobasal, suplemento de indução neural e 1% de solução de penicilina-estreptomicina suplementada com 10 μ M de inibidor de ROCK Thiazovivin. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas. Ao atingirem 90% de confluência, as NSCs foram dissociadas com Accutase e plaqueadas a uma densidade de 5×10^4 células/cm² em frascos de cultura de 25 cm² revestidos com Geltrex em meio de indução de astrócitos contendo meio DMEM/F12 (Gibco, cat n. 12400024), suplemento N2 (Gibco, cat n. 17502048), 1% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, cat n. 12657-029) e 1% de solução de antibiótico-antimicótico (Gibco, cat n. 15240112). A troca de meio foi realizada a cada 48 horas por 21 dias. Durante este período, ao atingir 100% de confluência, as células foram expandidas na proporção de 1:3 usando Accutase para frascos de cultura de 75 cm² revestidos com Geltrex. No final da diferenciação, o meio foi trocado

para meio de maturação de astrócitos (MMA) - DMEM/F12, 10% de SFB e 1% de solução de antibiótico-antimicótico - por um período adicional de pelo menos 5 semanas. Durante este período, o meio foi trocado duas vezes por semana e, ao atingir 100% de confluência, as células foram dissociadas usando tripsina/EDTA 0,125% (Gibco, cat n. 25200072) e expandidas para frascos de cultura de 175 cm² na proporção de 1:2 (sem revestimento de Geltrex). As células foram mantidas em condições de cultura padrão (95% de umidade relativa e 5% de CO₂ a 37°C) e testadas rotineiramente quanto à contaminação por micoplasma, conforme descrito anteriormente (Molla Kazemiha *et al.*, 2009).

3.3 Tratamento das células

Após 9 semanas de maturação, ao atingir 100% de confluência em frascos de cultura de 175 cm², os astrócitos derivados de hiPSCs foram dissociados com Tripsina/EDTA 0,125% (Gibco, cat n. 25200072) e plaqueados a 1x10⁴ células/cm² em placas de 6 poços. Após 5 dias em cultura, as células foram lavadas três vezes com PBS e o meio foi substituído por DMEM/F12 sem SFB por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com CTEP 10 µM (Axon Medchem, cat n. Axon 1972), 10 µM DHPG (Tocris, cat no. 0805) ou veículo (Dimetilsulfóxido (DMSO); Sigma-Aldrich, cat n. 41639) e subsequentemente estimuladas com 10 ng/mL de rTNF-α (BioLegend, cat no. 717904) por 4h ou 24h. Os fármacos foram mantidos no meio durante todo o experimento. Após o tratamento, o sobrenadante foi congelado rapidamente e armazenado a -80°C até uso posterior. As células foram coletadas com 1 mL de Reagente TRIzol™ (Invitrogen, cat n. 15596018) e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL sendo, então, congeladas a -80°C.

3.4 RT-PCR quantitativo

O RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante e ressuspendido em 12 µL de água livre de nucleases. A concentração e a qualidade do RNA foram analisadas por espectrofotômetro (Multiskan® GO, Thermo Scientific). Os cDNAs foram preparados a partir de 800 ng de RNA total em uma reação final de transcrição reversa de 20 µL. A RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) foi realizada com cDNA diluído 10x usando o Power SYBR® Green PCR Master Mix na plataforma QuantStudio™ 7 Flex real-time PCR system (Applied Biosystems®). Ensaios de RT-qPCR foram realizados NM_001145775.3s para quantificar os níveis de mRNA dos

seguintes genes: *TNF* (NM_000594.4); *CXCL8* (NM_000584.4); *IL6* (NM_000600.5) *C3* (NM_000064.3); *C4* (NM_001352000.1) *IPO8* (NM_006390.3); *RPLP0* (NM_001002.3); *MERTK* (NM_006343.2); *MEGF10* (NM_032446.3); *AXL* (NM_001699.6); *ITGB5* (NM_001354764.2); *ITGAV* (NM_001144999.3); *LRP1* (NM_002332.3) *SERPINA3* (NM_001085.5); *VCAM1* (NM_001078.5); *S100A10* (NM_002966.3); *BDNF* (NM_170735.6); *GPC4* (NM_001448.3); *SPARCL1* (NM_004684.6) *THBS1* (NM_003246.4), *FKBP5* (NM_001145775.3), *SERPING1* (NM_000062.3), *GBP2* (NM_004120.5), *NFATC3* (NM_173163.3), *NFATC4* (NM_001198967.3), *GRM5* (NM_001384268.1) e *GRM1* (NM_001278065.2). Os iniciadores foram projetados utilizando o Programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007). As sequências de primers estão listadas no Quadro 1.

A verificação prévia de formações secundárias indesejadas ou dímeros entre iniciadores foi realizada usando a ferramenta “OligoAnalyser 3.1” (Integrated DNA Technologies©), disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. Todos os primers utilizados neste trabalho foram validados por ensaio de diluição seriada e a eficiência da reação foi calculada, compreendendo 90-110% (dados não mostrados). As alterações na expressão gênica foram calculadas pelo método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando a média dos genes *housekeeping* *IPO8* e *RPLP0* para normalização.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores utilizados no qPCR.

Alvo	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')
C3	CTGCCCAGTTTCGAGGTCAT	CGAGCCATCCTCAATCGGAA
C4	TTCCGCAGTACCCAAGACAC	TGGGACTTGAACCCATTCCG
TNF-α	CTGCACTTTGGAGTGATCGG	TGAGGGTTTGCTACAACATGGG
CXCL8	GAGAGTGATTGAGAGTGGAC	GAATTCTCAGCCCTCTTCAAA
IL6	AGAGGCACTGGCAGAAAAC	TGCAGGAACTGGATCAGGAC
IPO8	TCCGAAC TATTATCGACAGGACC	GTTCAAAGAGCCGAGCTACAA
RPLP0	TTAAACCCTGCGTGGCAATC	ATCTGCTTGGAGCCCACATT
MERTK	TGGCGTAGAGCTATCACTG	CTGGCGTGAGGAAGGGATAA
MEGF10	ACTGGATTGGGACAGCATCA	GGATGTGGGTATGACTCTTGC
AXL	GTGGGCAACCCAGGGAATATC	GTA CTGTCCCGTGTCGGAAAG
ITGAV	AATCTTCCAATTGAGGATATCAC	AAAACAGCCAGTAGCAACAAT

LRP1	CTATCGACGCCCCTAAGACTT	CATCGCTGGGCCTTACTCT
ITGB5	GGAGCCAGAGTGTGGAAACA	GAAACTTTGCAAACCTCCCTC
SERPINA3	CCTGAGGCAGAGTTGAGAATGG	TCAAGTGGGCTGTTAGGGTG
VCAM1	CGAACCCAAACAAAGGCAGA	ACAGGATTTTCGGAGCAGGA
S100A10	AACAAAGGAGGACCTGAGAGTAC	CTTTGCCATCTCTACACTGGTCC
BDNF	AGTTGGGAGCCTGAAATAGTGG	AGGATGCTGGTCCAAGTGGT
GPC4	GTCAGCGAACAGTGCAATCAT	ACATTTCCCACCACGTAGTAAC
THBS1	GCCAACAAACAGGTGTGCAA	GCAGATGATGCCATTGCCAG
SPARCL1	GACCAACAGGGAAAACCTCA	TGCAGGCTCCAAAATAATCC
FKBP5	AATGGTGAGGAAACGCCGAT	GCCTTGATGACTTGGCCTTTG
SERPING1	AGCAAGAAGTACCCTGTGGC	GCTGAGAGCCTGTTCCATGT
GBP2	AATTAGGGGCCCAGTTGGAAG	AAGAGACGGTAACCTCCTGGT
NFATC3	GCGGCCTGCAGATCTTGAGC	TGATGTGGTAAGCAAAGTGGTGTGGT
NFATC4	CCCCGAGTACAGCAACAAGA	CCTCTTTGCAGATCACAGGC
GRM5	ATGCCGGGTGACATCATTATT	TGAATGCCATACTGTTACGG
GRM1	CCACAAGCATCGACCTGAGT	TCCCCATAATTCCCTTCCGTG

3.5 Imunofluorescência

Após 5 semanas de maturação, os astrócitos derivados de hiPSCs foram plaqueados em lamínulas de vidro limpas revestidas com 50 µg/mL de poli-D-lisina (Sigma, cat n. P6407) em placas de 24 poços a 1×10^3 células/cm² em MMA. Após 5 dias em cultura, as células foram fixadas durante 15 min em paraformaldeído a 4% (PFA) (Sigma, cat n. 158127) diluído em PBS. As amostras foram permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100 (Labsynth, cat n. T2502) diluído em PBS (PBST) por 10 min e bloqueadas com 2% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, cat n. A7906) diluída em PBST (solução de bloqueio) durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários diluídos em solução bloqueadora: anti-mGluR5 (1:100, Millipore, cat no. AB5675), anti-S100β (1:200, Abcam, cat n. ab52642) e anti-GFAP (1:200, *Cell Signaling*, cat n. 12389). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com o seguinte anticorpo secundário e reagentes de coloração diluídos em solução de

bloqueio: anti-Coelho IgG Alexa Fluor 488 (1:400, Invitrogen, cat n. A- 11008), Hoechst (1:500, Invitrogen, cat n. H3570) e Alexa Fluor 633 Phalloidin (1:1000, Invitrogen, cat n. A22284). As lamínulas foram lavadas três vezes como mencionado acima e montadas em lâminas de vidro limpas com DAKO Mounting Medium (Agilent Technologies, cat n. S302380-2). Os astrócitos foram fotografados usando um microscópio confocal a laser Nikon A1 (CGB, UFMG, Brasil).

3.6 Isolamento e marcação de sinaptoneurossomos

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA nº 120/2017). Um camundongo C57BL/6 do tipo selvagem, macho, com 12 meses de idade, foi obtido no Biotério Central da UFMG. O cérebro do camundongo foi dissecado, pesado e cortado em seções de aproximadamente 100 mg que foram transferidas individualmente para um homogeneizador Dounce estéril resfriado com 1 mL de tampão de isolamento de sinaptoneurossomos (SIB) (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, DTT 0,5 mM e inibidores de protease, pH 7,0; filtrado estéril) (Villasana *et al.*, 2006). O tecido foi quebrado por 10 movimentos lentos de sobe e desce e os homogeneizados foram transferidos para tubos cônicos de microcentrifuga de 1,5 mL e centrifugados a 1200 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e centrifugado a 15.000 g por 20 min a 4°C. A fração de debris em *pellet* e uma pequena alíquota do sobrenadante (homogeneizado sinaptoneurossômico) foram coletados em SIB e armazenados a -80°C para validação posterior. O sobrenadante (fração citosólica) foi coletado em novos tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e congelado a -80°C e o *pellet* de sinaptoneurossomos foi ressuspenso em SIB + 5% DMSO (Sigma, cat n. D8418), aliquotado e congelado a -80°C até uso posterior.

No dia do ensaio de fagocitose, as alíquotas de sinaptoneurossomos foram descongeladas e a sua concentração proteica determinada através do Ensaio de Proteína de Bradford (Bio-rad, cat n. 5000205). Os sinaptoneurossomos foram centrifugados a 15.000 g durante 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em solução Vybrant CM-Dil 2 µM (Invitrogen, cat n. V22888) diluída em PBS estéril à temperatura ambiente. A marcação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os sinaptoneurossomos marcados com CM-Dil foram centrifugados como descrito acima, lavados duas vezes com PBS gelado para

remover o excesso de corante fluorescente e ressuspensos em PBS gelado, ajustando sua concentração para 0,25 µg/µL. Eles foram mantidos em gelo e protegidos da luz até a sua utilização no referido ensaio. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

3.7 Ensaio de fagocitose de sinaptoneurossomos

Astrócitos derivados de hiPSCs foram plaqueados em lamínulas de vidro limpas revestidas com 50 µg/mL de poli-D-lisina em placas de 24 poços a $5,5 \times 10^3$ células/cm² em MMA. Após 5 dias em cultura, as células foram lavadas três vezes com PBS e coradas com corante CellTracker Blue CMF₂HC 10 µM (Invitrogen, cat n. C12881) diluído em DMEM/F12 sem SFB e incubadas durante 45 min na incubadora de cultura celular. A solução corante foi removida, foi acrescentado DMEM/F12 fresco e os astrócitos foram carenciados por 22 h. No dia seguinte, as células foram pré-tratadas durante 1 h com CTEP 10 µM, DHPG 10 µM ou veículo (DMSO) e subsequentemente estimuladas com 10 ng/mL de rTNF-α durante mais uma hora. Em seguida, 1,875 µg (7,5 µL) de sinaptoneurossomos marcados com CM-Dil foram adicionados a cada poço e incubados durante 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS à temperatura ambiente para remover o material não fagocitado e fixadas durante 15 min com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% diluída em PBS. As lamínulas foram lavadas três vezes, como mencionado acima, e montadas em lâminas de vidro limpas com DAKO *Mounting Medium*. As imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal a laser Nikon A1. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e duas vezes de forma independente.

As imagens foram analisadas utilizando os programas FIJI (v. 1.53t) e CellProfiler (v. 4.2.5). Resumidamente, os canais correspondentes aos astrócitos marcados com CellTracker e dos sinaptoneurossomos marcados com CM-Dil foram divididos e as imagens pré-processadas usando macros no FIJI, respectivamente, salvas e exportadas no formato .tif. Arquivos .tif pré-processados foram importados para o CellProfiler e analisados. O Índice de Fagocitose (IF) foi calculado para cada célula usando a fórmula abaixo:

$$IF = \frac{\text{Área de sinaptoneurossomos fagocitados } (\mu\text{m}^2)}{\text{Área celular total } (\mu\text{m}^2)}$$

Projeções ortogonais e renderização 3D (Figura 11) de z-stacks foram geradas usando FIJI e FluoRender (v. 2.29.2), respectivamente.

3.8 Immunoblotting

A concentração de proteínas nas frações da preparação sinaptoneurossomal (resíduos em pellet, homogeneizado sinaptoneurossômico, fração citosólica e sinaptoneurossomos isolados) foi medida utilizando o ensaio de Bradford. 25 µg de cada fração foram diluídos em tampão de amostra Laemmli, fervidos a 95°C por 5 minutos e separados em gel SDS-PAGE a 10%. As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad, cat n. 1620115), bloqueadas com 5% de BSA e 0,1% de Tween-20 (Labsynth, cat n. T1028) diluído em TBS (TBST) por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários em solução de 3% de BSA diluída em TBST: anti-sintaxina1 (1:200, Santa Cruz, cat no. sc-12736), anti-Homer (1:500, Santa Cruz, sc-8921) e anti-vinculina (1:10000, Abcam, ab129002). Após a incubação, os anticorpos primários foram removidos, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários em 3% de leite desnatado diluído em TBST: IgG anti-rato conjugado com HRP (1:2500, Millipore, cat n. AP308P), IgG anti-coelho conjugado com HRP (1:2500, Bio-Rad, cat n. 1706515) e IgG anti-cabra conjugado com HRP (1:2500, Santa Cruz, sc-2354). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes conforme descrito anteriormente e incubadas por 5 min com o Reagente de Detecção ECL Prime Western Blot (Cytiva, cat n. RPN2232) para detecção por quimioluminescência utilizando a plataforma ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.9 Quantificação de citocinas

As citocinas foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura celular por citometria de fluxo utilizando o Kit de Citocinas Inflamatórias Humanas *BD Cytometric Bead Array* (CBA) (Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences, cat n. 551811) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, quantidades iguais de cada esfera de captura para IL-8, IL-1β, IL-6, interleucina-10 (IL-10), TNF-α e interleucina-12p70 (IL-12p70) foram misturadas em um único tubo. 50 µL da mistura de esferas de captura foram adicionados aos tubos de ensaio, seguidos pela adição de 50 µL dos sobrenadantes de cultura celular ou diluições para montagem da curva padrão. Em

seguida, 50 μ L do reagente de detecção PE foram adicionados, e os tubos de ensaio foram incubados protegidos da luz por 3 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram lavadas com 1 mL de tampão de lavagem e os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram aspirados e descartados, e os pellets de esferas foram ressuspensos em 300 μ L de tampão de lavagem. A aquisição de dados foi realizada no FACS Aria Fusion (BD Biosciences). O software de análise de CBA (BD Biosciences) foi utilizado para análise de dados com base em curvas de concentração padrão, e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.10 Análise estatística

A análise estatística e a montagem de gráficos foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism versão 8.0.1. Foi assumida distribuição normal, e foram utilizados em todos os experimentos (exceto os explicitados de outra forma) *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, com um nível de confiança definido em 0,95 ($\alpha = 0,05$) como o limite mínimo aceitável. Para o ensaio de fagocitose de sinaptoneurossomos, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado, indicando que os dados seguiam uma distribuição log-normal. Dessa forma, um modelo linear generalizado ajustado à distribuição log-normal, seguido pelo pós-teste de Sidak, com um nível de confiança definido em 0,99 ($\alpha = 0,01$) como o limite mínimo aceitável, foi empregado. Esses dados foram analisados utilizando o software STATA (v. 14.0).

4. RESULTADOS

4.1 A inibição do mGluR5 é capaz de modular a resposta inflamatória induzida por rTNF- α em astrócitos humanos

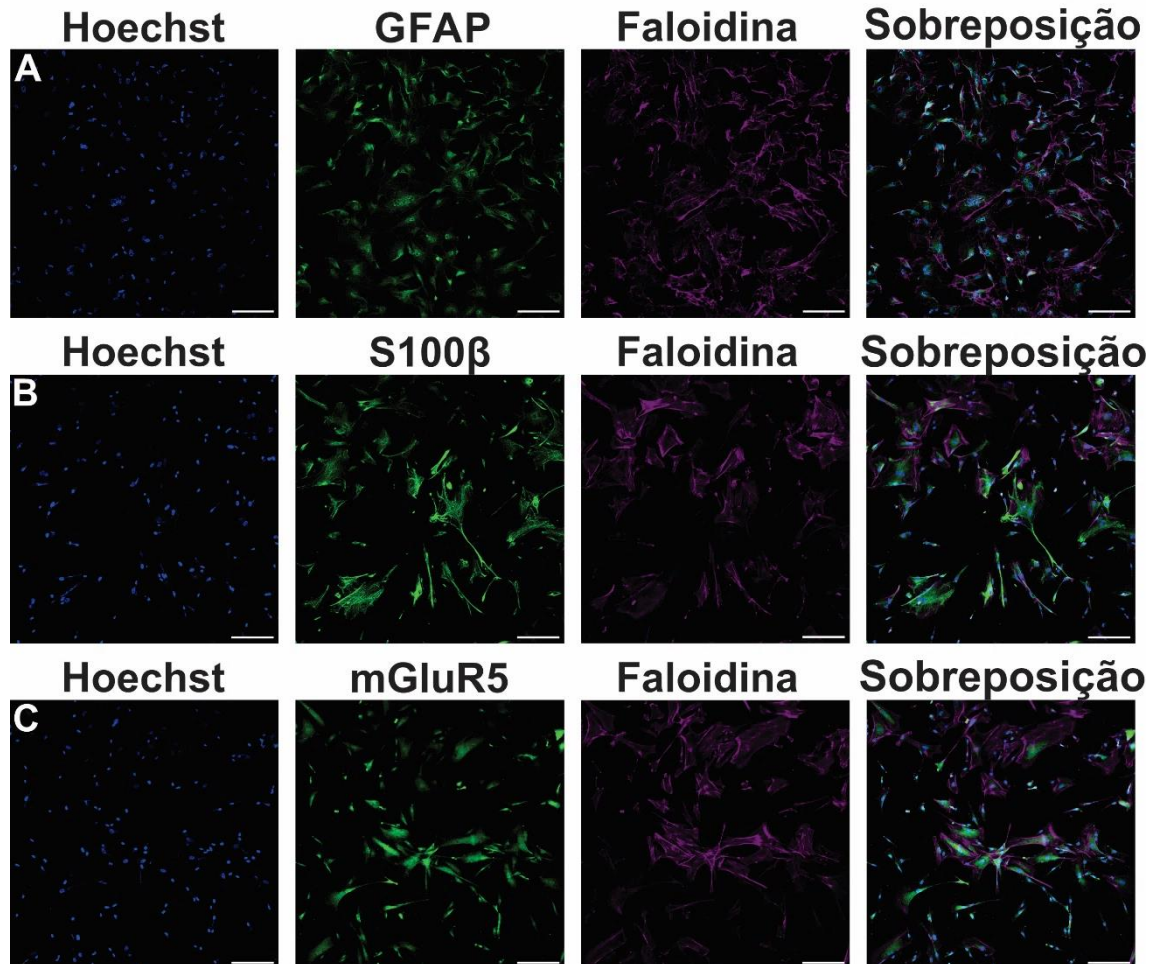


Figura 4. Caracterização de astrócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs). (A) Micrografias confocais de varredura a laser representativas de astrócitos derivados de hiPSCs imunomarcados para Hoechst (azul), GFAP (verde) e faloidina (magenta). (B) Micrografias confocais de varredura a laser representativas de astrócitos derivados de hiPSCs imunomarcados para Hoechst (azul), S100 β (verde) e faloidina (magenta). (C) Micrografias confocais de varredura a laser representativas de astrócitos derivados de hiPSCs imunomarcados para Hoechst (azul), mGluR5 (verde) e faloidina (magenta). Escala = 200 μ m.

A função do mGluR5 na modulação da resposta de astrócitos humanos à inflamação ainda é muito pouco conhecida. Para elucidar a influência deste receptor metabotrópico em astrócitos sob condições pró-inflamatórias, hiPSCs foram diferenciadas em astrócitos por quatro semanas e passaram pelo processo de maturação por pelo menos cinco semanas. Para avaliar a eficácia da diferenciação, astrócitos com cinco semanas de maturação foram caracterizados, empregando

marcadores específicos para essas células, nomeadamente GFAP e S100 β . Conforme observado na figura 4, as células foram positivas para ambos os marcadores (em verde), confirmando a diferenciação bem-sucedida das hiPSCs em astrócitos. Verificou-se, também, que estas células expressam mGluR5 (figura 4 C e figura 5 A e B). Adicionalmente, foram analisados os níveis de mRNA do mGluR5 em astrócitos estimulados com 10 ng/mL de rTNF- α ou veículo, e tratados com 10 μ M de CTEP, 10 μ M de DHPG ou veículo (DMSO). Os dados indicaram que nenhum dos tratamentos alterou a expressão do mGluR5 nos astrócitos (figura 5 A e B). Visto que, mGluR1 é um dos alvos do agonista DHPG (Wisniewski; Car, 2002), os níveis de mRNA desse receptor também foram analisados. Os dados mostraram que os astrócitos expressam mGluR1 em níveis reduzidos (figura 5 C-D). Também é possível notar que rTNF- α , CTEP e DHPG não alteraram a expressão deste receptor.

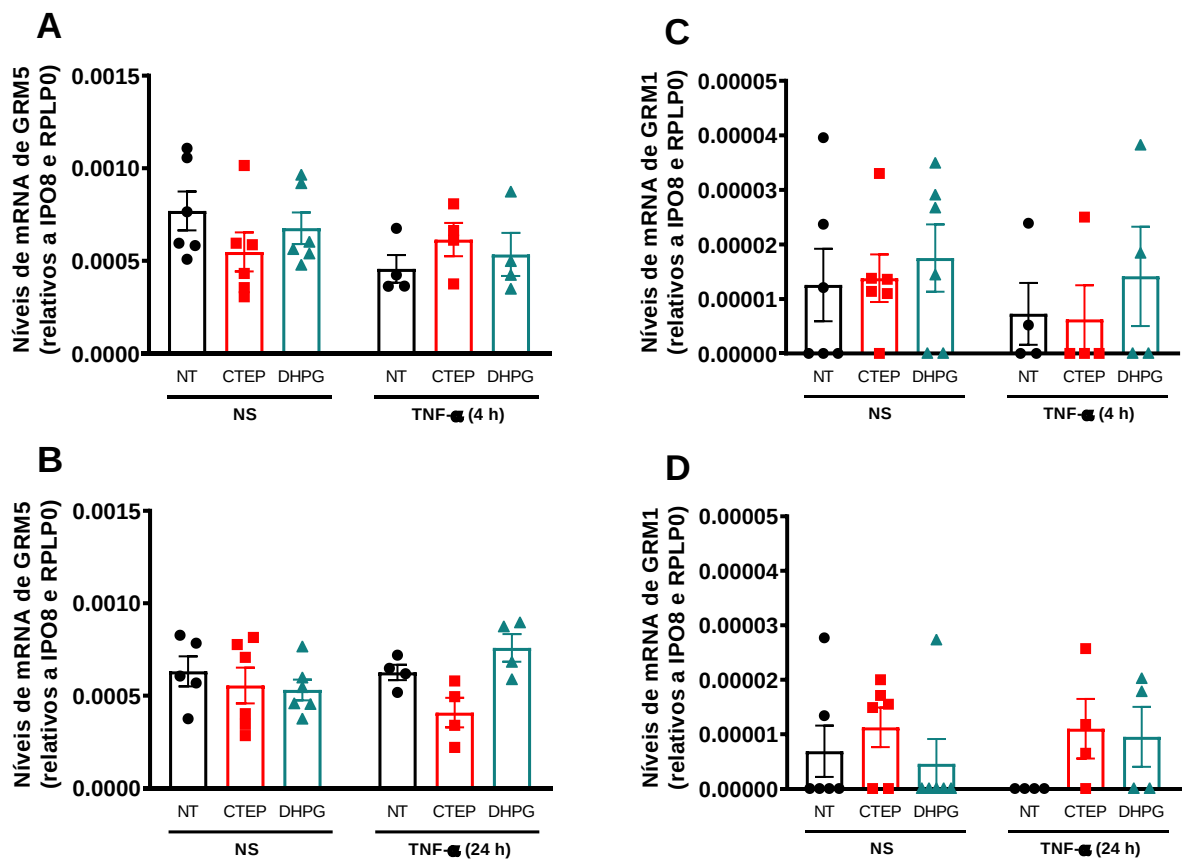


Figura 5. Astrócitos derivados de hiPSCs expressam mGluR5 e mGluR1. Os gráficos mostram os níveis de mRNA do mGluR5 (*GRM5* - A e B) e mGluR1 (*GRM1* - C e D) em astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/ml) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A e C) ou 24 h (B e D). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, que foi realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, n=4-6.

Para verificar se a estimulação com rTNF- α foi capaz de induzir uma resposta inflamatória, analisou-se os níveis proteicos de IL-1 β , IL-10, IL-12p70, TNF- α , IL-6 e IL-8 no sobrenadante dos astrócitos estimulados com rTNF- α ou veículo, e tratados com CTEP, DHPG ou veículo. A produção de IL-1 β , IL-10, IL-12p70 não foi detectada. Por outro lado, como observado na figura 6 (A-F), o tratamento com rTNF- α induziu um aumento nos níveis TNF- α , IL-6 e IL-8, tanto após 4h quanto após 24h. Os níveis proteicos de IL-6 e IL-8 aumentaram ligeiramente no tempo de 4h, com uma elevação expressiva no tempo de 24h. O tratamento com CTEP provocou uma redução nos níveis de TNF- α e IL-6 após 4h (figura 6 A e C). Já com 24h, a inibição do mGluR5 não causou diminuição dos níveis dessas citocinas (figura 6 B e D). Em oposição, o DHPG não foi capaz de modular os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-8 em nenhum dos tempos analisados (figura 6 A-F).

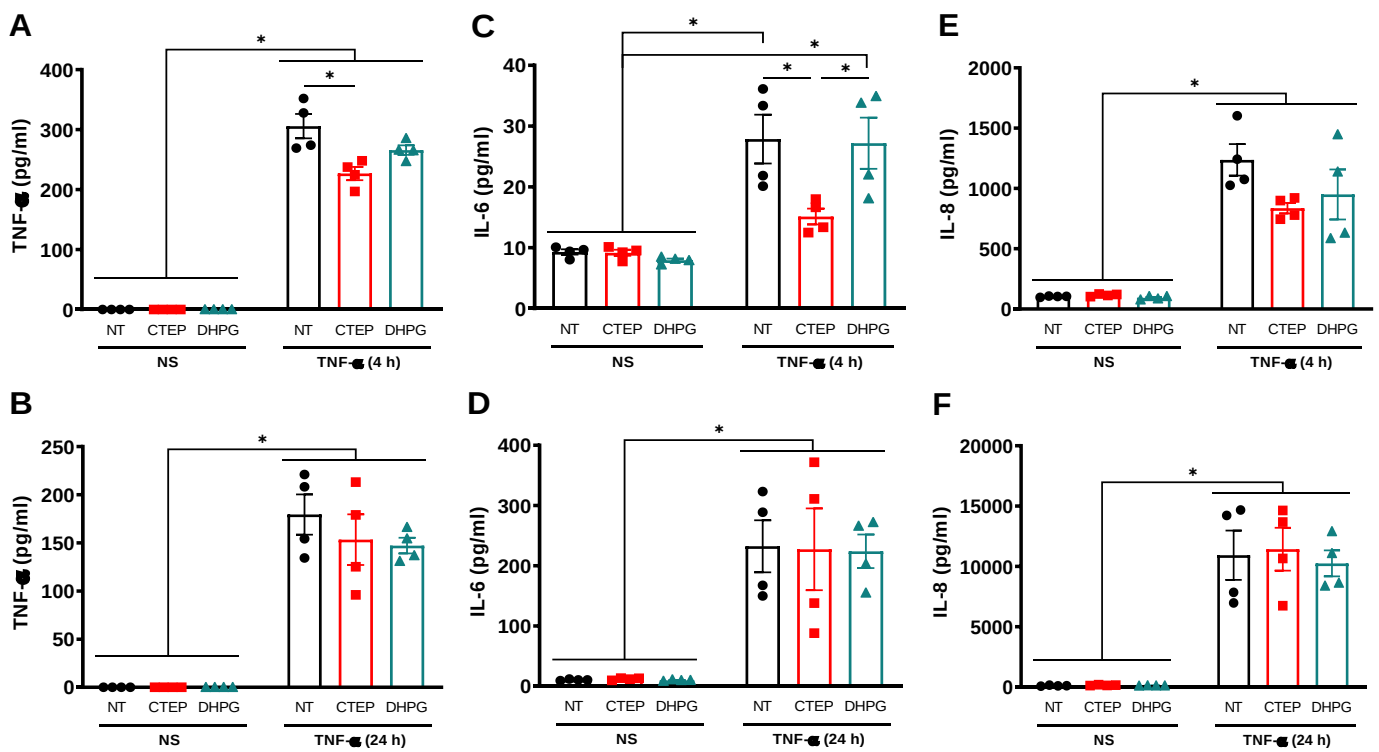


Figura 6. CTEP reduz a expressão de fatores inflamatórios induzida por rTNF- α . Os gráficos mostram a quantificação dos níveis proteicos de TNF- α (A e B), IL-6 (C e D) e IL-8 (E e F) no sobrenadante de astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C e E) ou 24h (B, D e F). Os níveis proteicos foram avaliados por CBA, realizado em duplicatas. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, n=4-6. * (p<0,05) indica diferenças estatisticamente significativas.

Os níveis de mRNA de TNF- α , IL-6 e IL-8 também foram analisados. A estimulação com rTNF- α induziu um aumento do mRNA dessas citocinas inflamatórias tanto após 4h quanto após 24h (figura 7 A-F). A inibição do mGluR5 com CTEP resultou na redução dos níveis de TNF- α após 24h em relação ao grupo não tratado (NT) (figura 7 B). Além disso, CTEP levou a uma diminuição nos níveis de mRNA de IL-6 após 4h, em comparação com o grupo tratado com DHPG (figura 7 C). Observou-se também uma redução nos níveis de mRNA de IL-8 após 4h no grupo tratado com CTEP (figura 7 E). De maneira interessante, após 24h, houve um aumento de IL-6 e IL-8 nos grupos tratados com CTEP, indicando que o efeito anti-inflamatório desse tratamento pode ser transitório (figura 7 D e F). Por sua vez, DHPG não alterou os níveis dessas citocinas em nenhuma das condições analisadas. Estes dados indicam que a inibição da sinalização do mGluR5 reduz transitoriamente a produção de citocinas pró-inflamatórias por astrócitos humanos estimulados com rTNF- α .

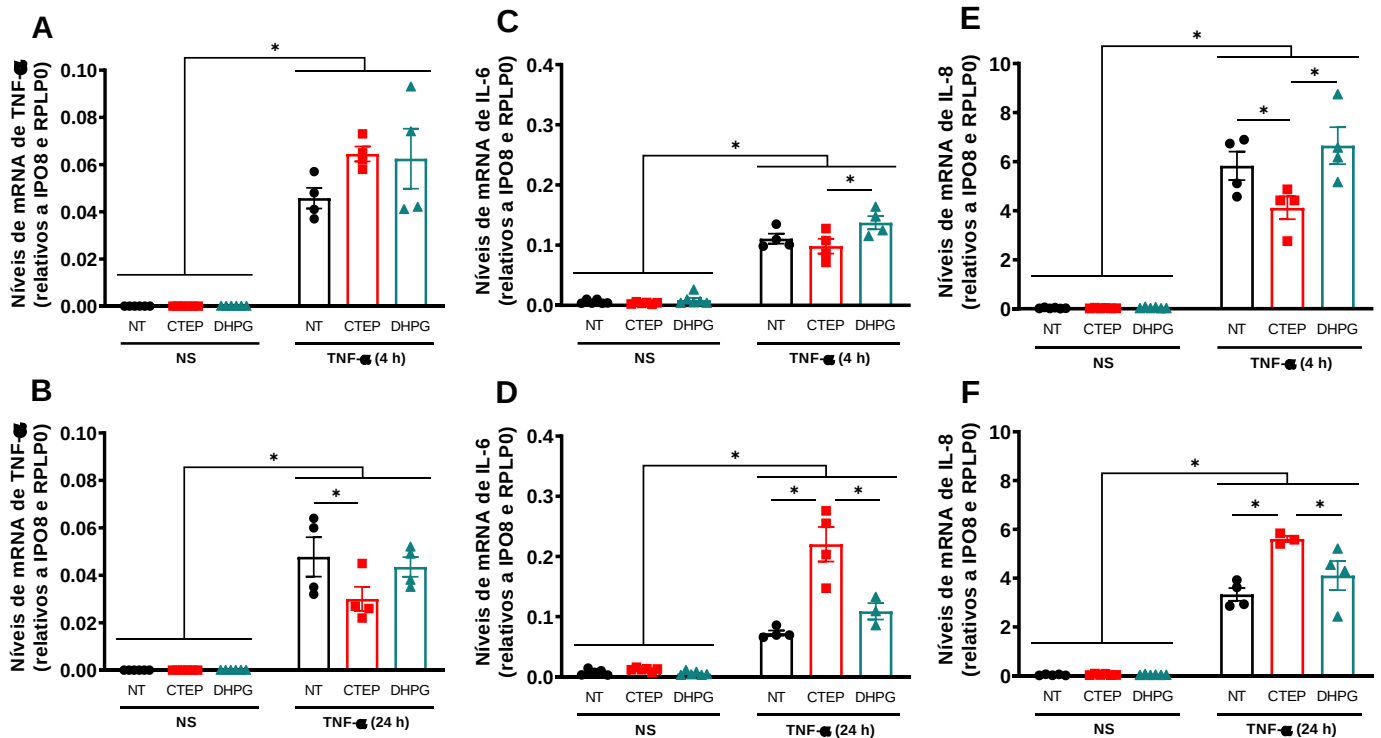


Figura 7. CTEP modula os níveis de mRNA de mediadores inflamatórios em astrócitos estimulados com rTNF- α . Os gráficos mostram os níveis de mRNA de TNF- α (A e B), IL-6 (C e D) e IL-8 (E e F) em astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C e E) ou 24h (B, D e F). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, n=3-6. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significativas.

4.2 A inibição do mGluR5 modula a expressão do marcador de astrócitos reativos *SERPINA3* em astrócitos humanos

A fim de dar continuidade à avaliação da reatividade astrocitária, os níveis de mRNA de marcadores de astrócitos reativos foram quantificados. Considerando a proposta de distinção entre os perfis de reatividade astrocitária A1 e A2 (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017), foram avaliados os níveis de mRNA dos marcadores gerais de reatividade membro 3 da família serpina A (*SERPINA3*), fator nuclear de células T ativadas 3 e 4 (*NFATC3* e *NFATC4*); dos marcadores de astrócitos reativos do tipo A1 complemento C3 (*C3*), complemento C4 (*C4*), molécula 1 de adesão celular vascular (*VCAM-1*), proteína de ligação ao guanilato 2 (*GBP2*), FKBP prolil isomerase 5 (*FKBP5*) e membro 1 da família serpina G (*SERPING1*); e do marcador do fenótipo A2 proteína A10 de ligação ao cálcio *S100A10* (Zamanian *et al.*, 2012; Liddelow *et al.*, 2017; Clarke *et al.*, 2018; Escartin *et al.*, 2021; Leng *et al.*, 2022).

O estímulo inflamatório rTNF- α causou um aumento nos níveis de mRNA de *SERPINA3*, *C3*, *VCAM-1* e *GBP2*, tanto após 4h quanto após 24h (figura 8 A-H), enquanto os níveis de *NFATC3*, *NFATC4*, *C4*, *FKBP5*, *SERPING1* E *S100A10* permaneceram inalterados (figura 9 A-L). Interessantemente, CTEP promoveu um aumento adicional na expressão do marcador geral de reatividade *SERPINA3* em todos os tempos analisados (figura 8 A e B). Por outro lado, DHPG aumentou a expressão de *SERPINA3* apenas no tempo de 4h (figura 8 A). Os dados indicam que a inibição do mGluR5 resulta em um aumento persistente dos níveis de mRNA do marcador de reatividade *SERPINA3* em condições pró-inflamatórias, sem afetar a expressão dos marcadores associados aos fenótipos reativos A1 e A2.

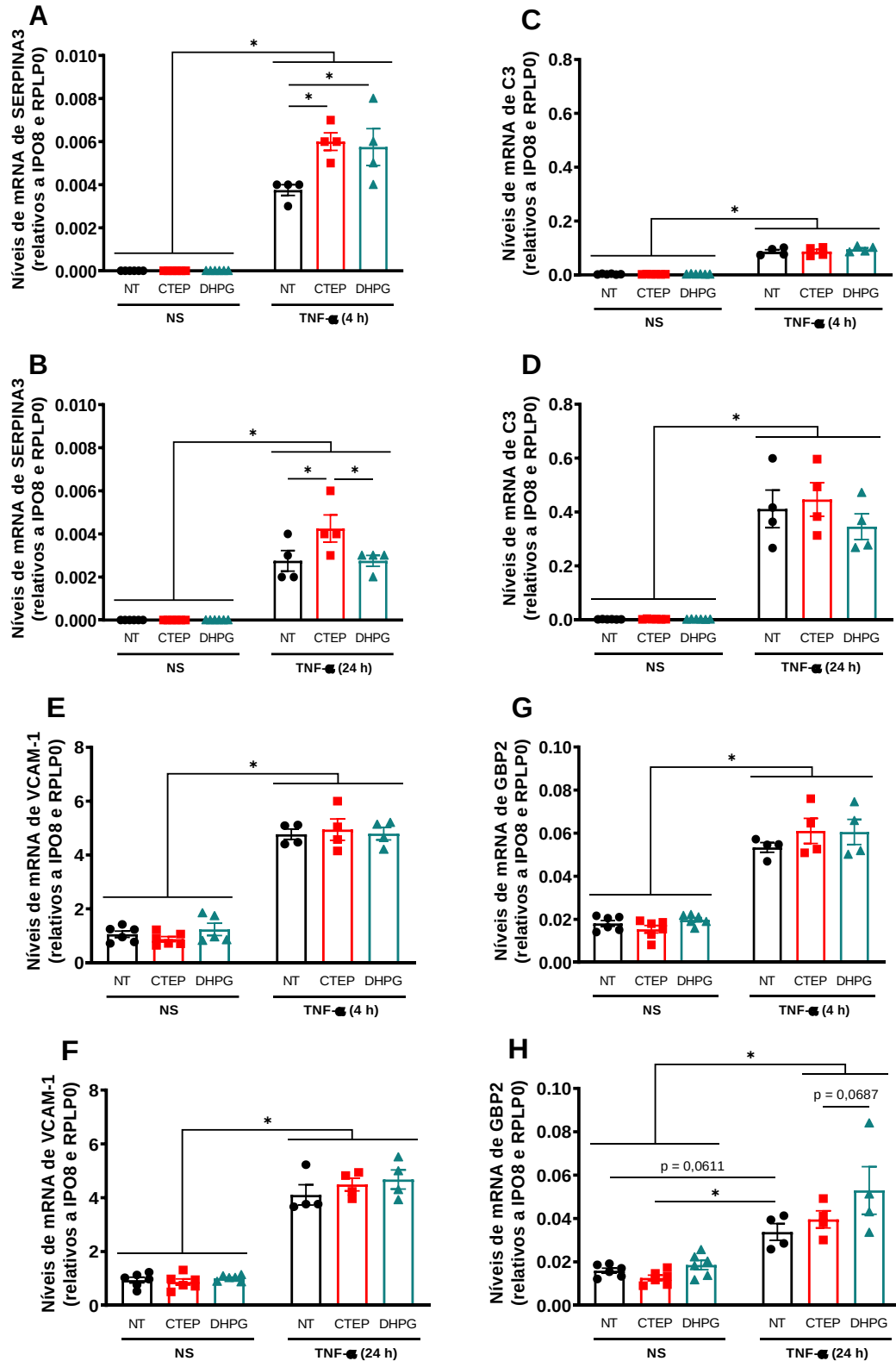


Figura 8. mGluR5 modula a expressão do marcador geral de astrócitos reativos *SERPINA3*. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *SERPINA3* (A e B), *C3* (C e D), *VCAM-1* (E e F) e *GBP2* (G e H) em astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C, E e G) ou 24 h (B, D, F e H). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, n=4-6. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significativas.

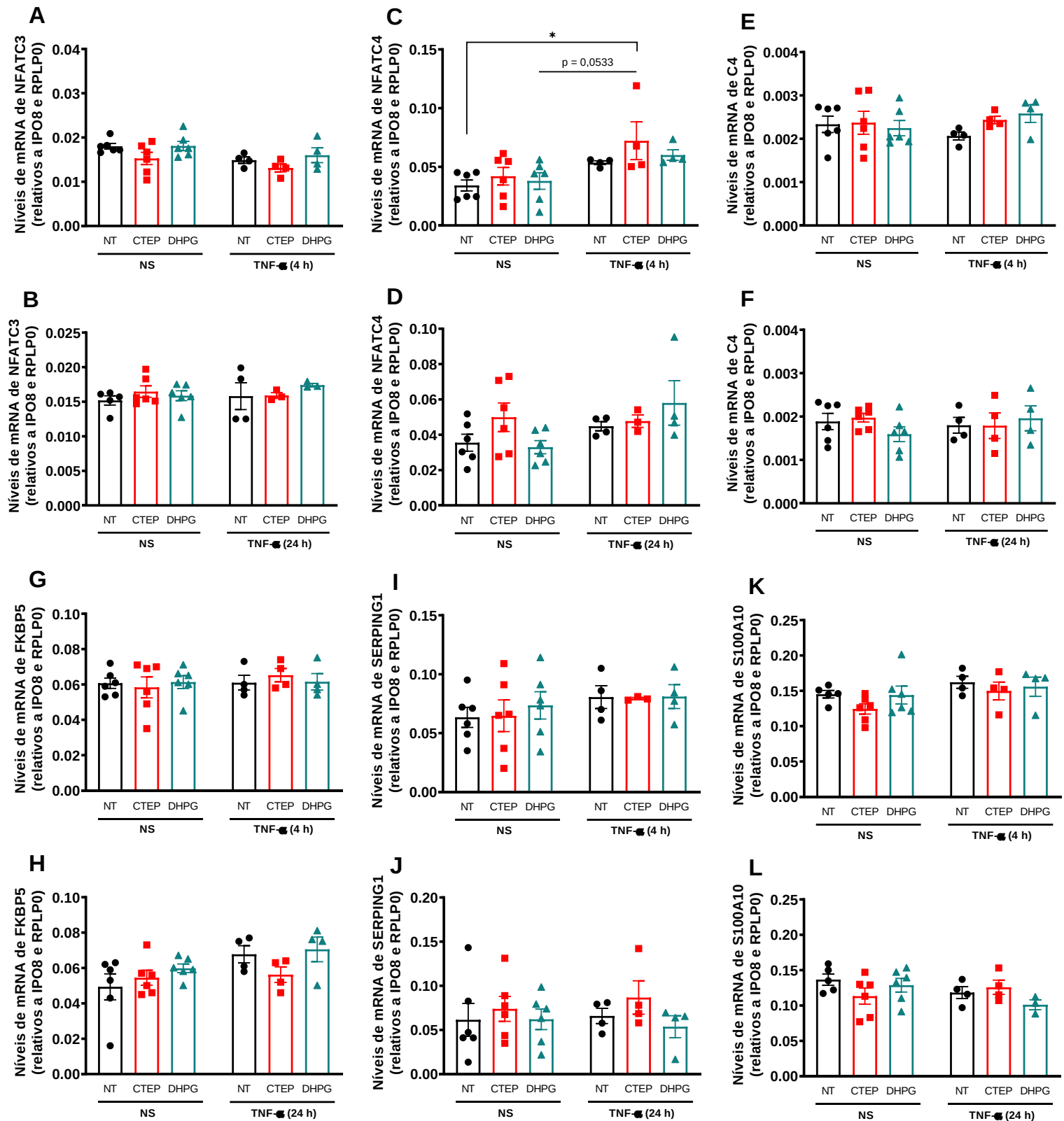


Figura 9. Expressão de marcadores de reatividade por astrócitos derivados de hiPSCs.

Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *NFATC3* (A e B), *NFATC4* (C e D), *C4* (E e F), *FKBP5* (G e H), *SERPING1* (I e J), e *S100A10* (K e L) em astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP 10 μ M ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C, E, G, I e K) ou 24h (B, D, F, H, J e L). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, N=4-6. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significativas.

4.3 A inibição do mGluR5 aumenta a fagocitose de material sináptico em astrócitos humanos

Visto que a astrogliose reativa também se traduz em modificações funcionais, incluindo alterações na habilidade de fagocitar material sináptico (Liddelow *et al.*, 2017), os níveis de fagocitose de astrócitos derivados de hiPSCs submetidos aos diferentes tratamentos foram examinados por meio de um ensaio de fagocitose de sinaptoneurossomos. Para isso, sinaptoneurossomos foram isolados a partir do cérebro de camundongos. Posteriormente, a eficácia do processo de isolamento foi avaliada através da quantificação de proteínas pré e pós-sinápticas. Conforme ilustrado na figura 10, a proteína pré-sináptica syntaxina-1 e a proteína pós-sináptica Homer foram enriquecidas na fração de sinaptoneurossomos, enquanto a vinculina, uma proteína do citoesqueleto, apresentou-se predominantemente no compartimento citosólico. Em seguida, foi verificado se os astrócitos derivados de hiPSCs seriam capazes de fagocitar sinaptoneurossomos com marcação fluorescente. Os dados mostraram que os astrócitos humanos foram capazes de engolfar material sináptico, conforme evidenciado pela presença de vários pontos vermelhos, correspondentes aos sinaptoneurossomos com marcação fluorescente, observados dentro do corpo celular dos astrócitos (figura 11 A e B).

Como ilustrado na figura 12, a estimulação com rTNF- α aumentou a fagocitose de sinaptoneurossomos em comparação com as células não estimuladas. Curiosamente, astrócitos tratados com CTEP ou DHPG demonstraram um aumento no índice de fagocitose em comparação com o grupo não tratado (figura 12 G). Notavelmente, astrócitos tratados com CTEP e estimulados com rTNF- α apresentaram índice de fagocitose mais alto do que aqueles tratados com veículo ou DHPG (figura 12 G). Ademais, astrócitos tratados com CTEP, tanto no grupo não estimulado quanto no grupo estimulado com rTNF- α , exibiram níveis semelhantes de fagocitose de sinaptoneurossomos (figura 12 G). Esses resultados indicam que o bloqueio do mGluR5 é suficiente para aumentar a fagocitose de material sináptico, independentemente da presença do estímulo pró-inflamatório.

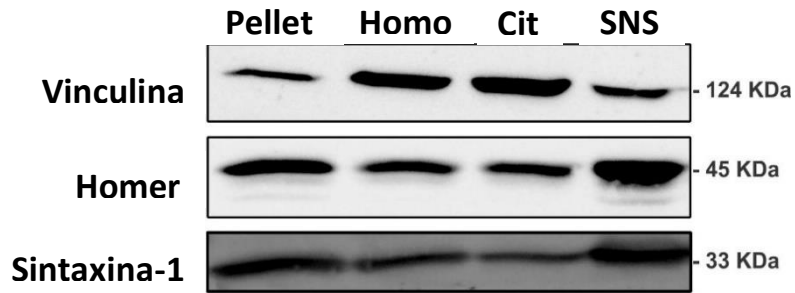


Figura 10. Sinaptoneurossomos isolados do cérebro de camundongos são enriquecidos em marcadores pré e pós-sinápticos. São mostrados imunoblots para vinculina (painel superior), Homer (painel intermediário) e syntaxina-1 (painel inferior) em frações de preparação de sinaptoneurossomos, incluindo *pellet*, homogenato (Homo), fração citosólica (Cit) e sinaptoneurossomos (SNS).

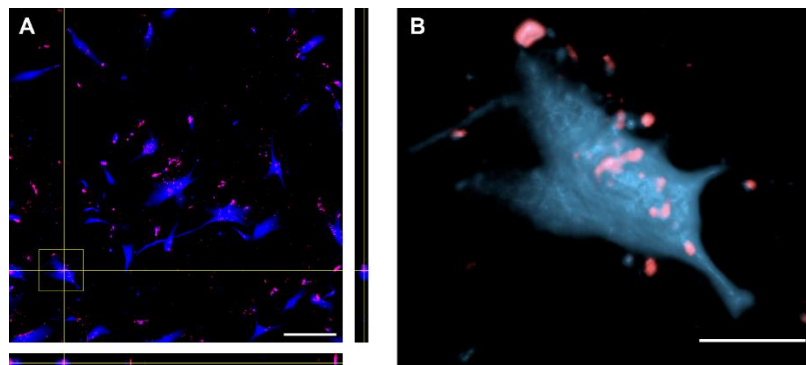


Figura 11. Astrócitos derivados de hiPSCs são capazes de fagocitar sinaptoneurossomos. São mostradas projeções ortogonais de séries Z (A) e a renderização 3D (B) do astrócito destacado em (A) de micrografias confocais de astrócitos derivados de hiPSCs marcados com CellTracker blue (azul) e sinaptoneurossomos marcados com Vybrant CM-Dil (vermelho). Escala= 200 μ m em (A) e 50 μ m em (B).

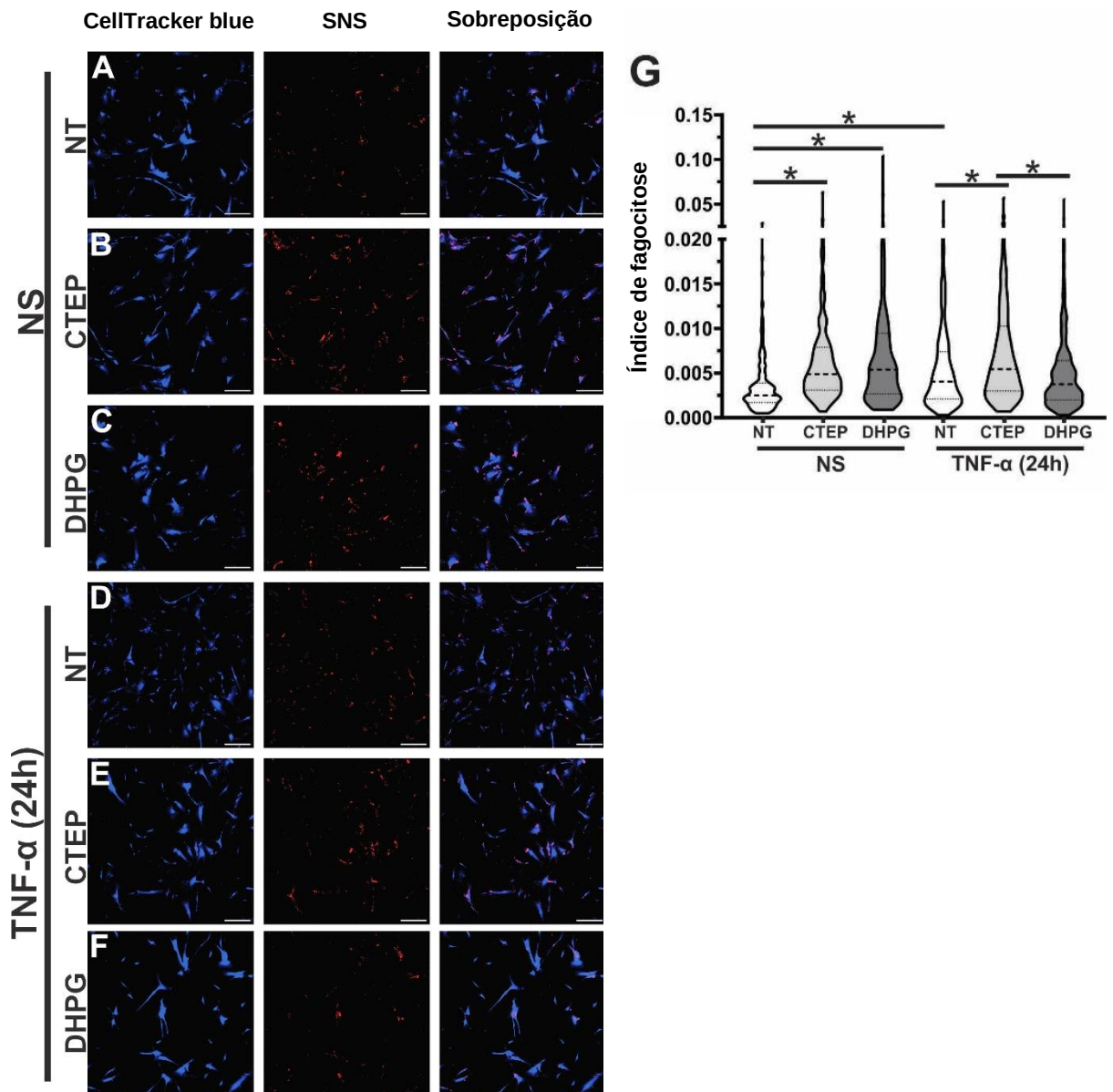


Figura 12. CTEP e rTNF- α aumentam o índice de fagocitose de astrócitos derivados de hiPSCs. As imagens mostram micrografias confocais de varredura a laser representativas de astrócitos derivados de hiPSCs marcados com CellTracker blue (azul) e sinaptoneurosomos (SNS) marcados com Vybrant CM-Dil (vermelho). Os astrócitos derivados de hiPSCs foram não estimulados (NS) e tratados com veículo (NT) **(A)**, CTEP (10 μ M) **(B)** ou DHPG (10 μ M) **(C)**, ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT) **(D)**, CTEP (10 μ M) **(E)** ou DHPG (10 μ M) **(F)** por 24 h. Escala = 200 μ m. **(G)** O gráfico apresenta o índice de fagocitose de astrócitos derivados de hiPSCs não estimulados (NS) ou estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), DHPG (10 μ M) ou CTEP (10 μ M) por 24 h. A linha tracejada representa a mediana e as linhas pontilhadas representam o intervalo interquartil, n=258-414. * (p<0,01) indica diferenças estatisticamente significativas.

Visto que foi demonstrado que os receptores de fagocitose tirosina quinase, proto onco-gene mer (*MERTK*) e múltiplos domínios semelhantes a EGF 10 (*MEGF10*) medeiam a eliminação sináptica realizada por astrócitos (Chung *et al.*,

2013; Lee *et al.*, 2021), foram analisados os níveis de mRNA desses receptores para verificar se alterações em sua expressão poderiam explicar as diferenças encontradas na atividade fagocítica dos astrócitos. A estimulação com rTNF- α reduziu os níveis de *MERTK* após 4 h e 24h (figura 13 A e B). Por outro lado, os tratamentos com CTEP e DHPG não influenciaram os níveis de mRNA desse receptor. Adicionalmente, os dados demonstraram que nenhum dos tratamentos alterou os níveis de mRNA de *MEGF10* nos astrócitos (figura 13 C e D).

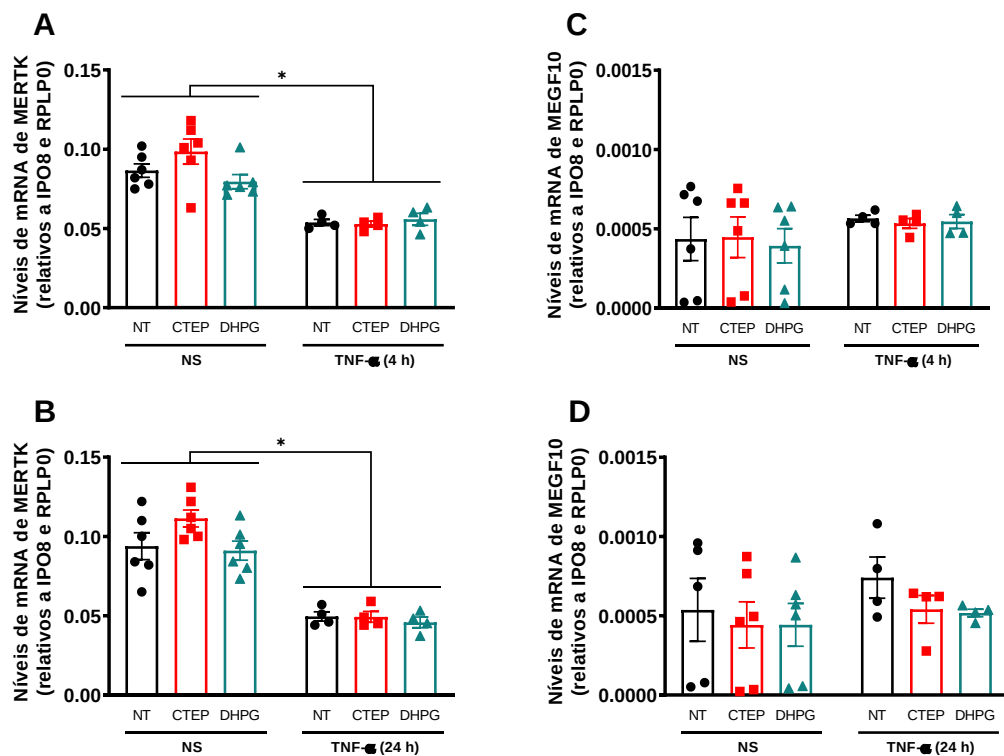


Figura 13. rTNF- α diminui a expressão de *MERTK* em astrócitos derivados de hiPSCs. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *MERTK* (A e B) e *MEGF10* (C e D) em astrócitos derivados de hiPSCs que não foram estimulados (NS) ou foram estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A e C) ou 24 h (B e D). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significativas.

Uma vez que os níveis de mRNA de *MERTK* e *MEGF10* não explicaram as alterações no índice de fagocitose de sinaptoneurossomos induzidas pelos diferentes tratamentos administrados, os níveis de mRNA de outros receptores astrocitários envolvidos na fagocitose de diferentes estruturas foram investigados, nomeadamente o receptor tirosina quinase AXL (AXL), a subunidade α V (*ITGAV*) e a subunidade β 5 (*ITGB5*) da integrina α V β 3/5 e a proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (*LRP1*) (Konishi *et al.*, 2022).

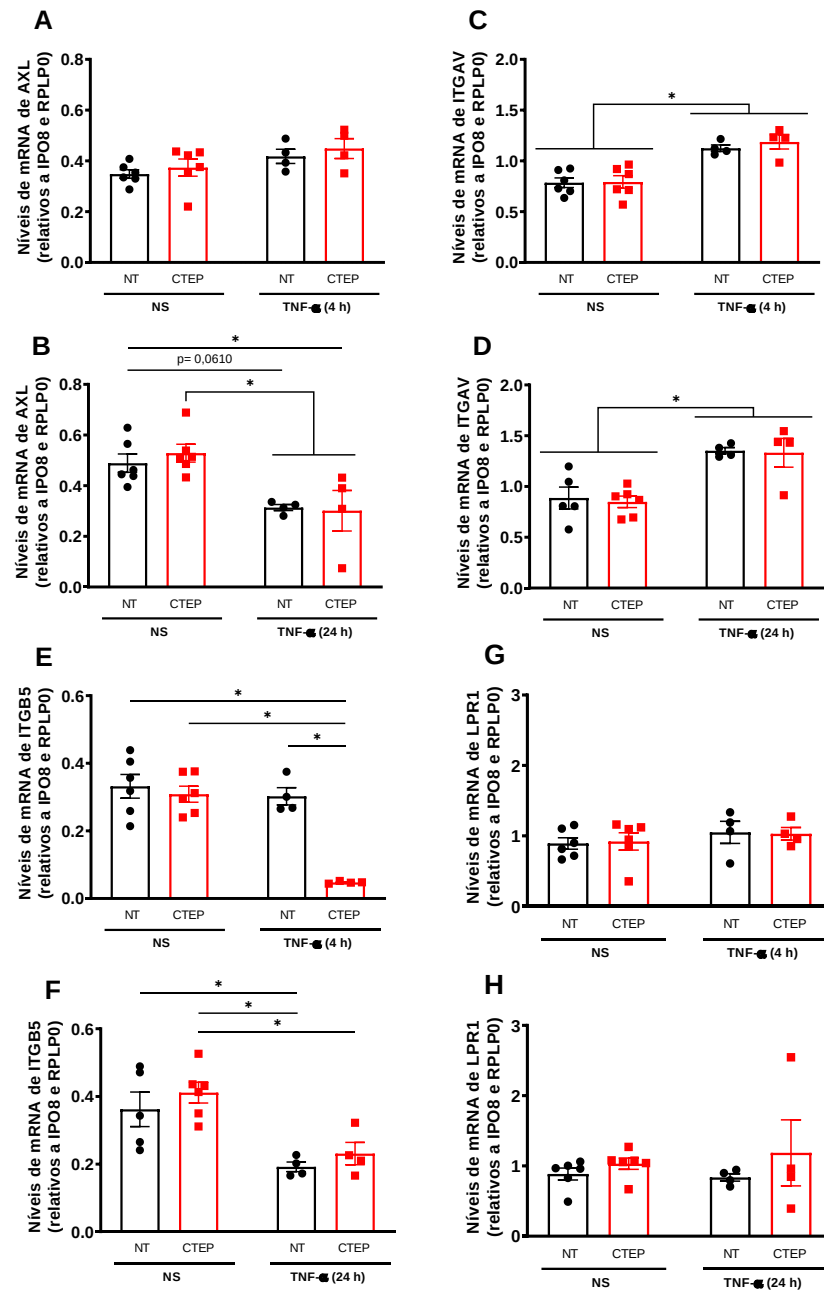


Figura 14. CTEP e rTNF- α podem modular os níveis de mRNA de receptores de fagocitose em astrócitos. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de AXL (A e B), ITGAV (C e D), ITGB5 (E e F) e LPR1 (G e H) em astrócitos derivados de hiPSCs que não foram estimulados (NS) ou foram estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C, E e G) ou 24 h (B, D, F e H). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de RPLP0 e IPO8. Os dados representam as médias $\pm$ SEM. * (p < 0,05) indica diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados indicaram que a estimulação com rTNF- α levou à diminuição dos níveis de mRNA de AXL apenas após 24h (figura 14 B). Embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, observou-se uma tendência de redução ao comparar o grupo não estimulado tratado com veículo (NS/NT) com o grupo

estimulado com rTNF- α tratado com veículo (TNF- α /NT) ($p=0,0610$) (figura 14 B). Além disso, o estímulo rTNF- α elevou os níveis de mRNA de *ITGAV* tanto após 4h quanto após 24h (figura 14 C e D). Surpreendentemente, CTEP diminuiu os níveis de mRNA de *ITGB5*, que também compõe a integrina $\alpha V\beta 3/5$, no grupo estimulado com rTNF- α após 4h (figura 14 E). Já após 24h, somente o tratamento com rTNF- α provocou essa redução (figura 14 F). A expressão de *LRP1* não foi afetada por nenhum dos tratamentos nos tempos analisados (figura 14 G e H). Portanto, diferentes receptores podem estar envolvidos na fagocitose induzida por rTNF- α e mGluR5 em astrócitos, com a integrina $\alpha V\beta 3/5$ possivelmente desempenhando um papel na fagocitose induzida por rTNF- α .

4.4 O tratamento com rTNF- α e a inibição do mGluR5 reduzem a expressão de moléculas sinaptogênicas em astrócitos humanos

A fim de prosseguir com a identificação de alterações funcionais possivelmente associadas à reatividade astrocitária, foram quantificados os níveis de mRNA de moléculas sinaptogênicas, uma vez que pesquisas anteriores demonstraram que o mGluR5 pode induzir a expressão dessas moléculas em astrócitos e promover a remodelação sináptica (Kim, S. K. *et al.*, 2016; Saitta *et al.*, 2021; Danjo *et al.*, 2022). Constatou-se que rTNF- α reduziu os níveis de mRNA de *BDNF* e de glipican-4 (*GPC4*) tanto após 4h quanto após 24h (figura 15 A-D), enquanto os níveis de mRNA de trombospondina-1 (*TSP1*) e da proteína 1 semelhante à SPARC (*SPARCL1*) permaneceram inalterados diante deste estímulo inflamatório (figura 15 E-H). Em contrapartida, o tratamento com CTEP diminuiu os níveis de mRNA de *BDNF* após 4h apenas no grupo não estimulado (figura 15 A). A administração de CTEP também reduziu os níveis de *TSP1* após 24h no grupo que não foi estimulado com rTNF- α , com uma forte tendência de redução observada no grupo estimulado com rTNF- α ($p=0,0611$) (figura 15 F). O tratamento com DHPG, por sua vez, não alterou os níveis de mRNA das proteínas sinaptogênicas em nenhum dos tempos e condições analisadas (figura 15 A-H). Esses dados sugerem que tanto o estímulo pró-inflamatório administrado quando a inibição da sinalização do mGluR5 podem comprometer a produção de moléculas sinaptogênicas, tendo o potencial de contribuir para a perda sináptica comumente observada em doenças neurodegenerativas (Cardozo *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2022).

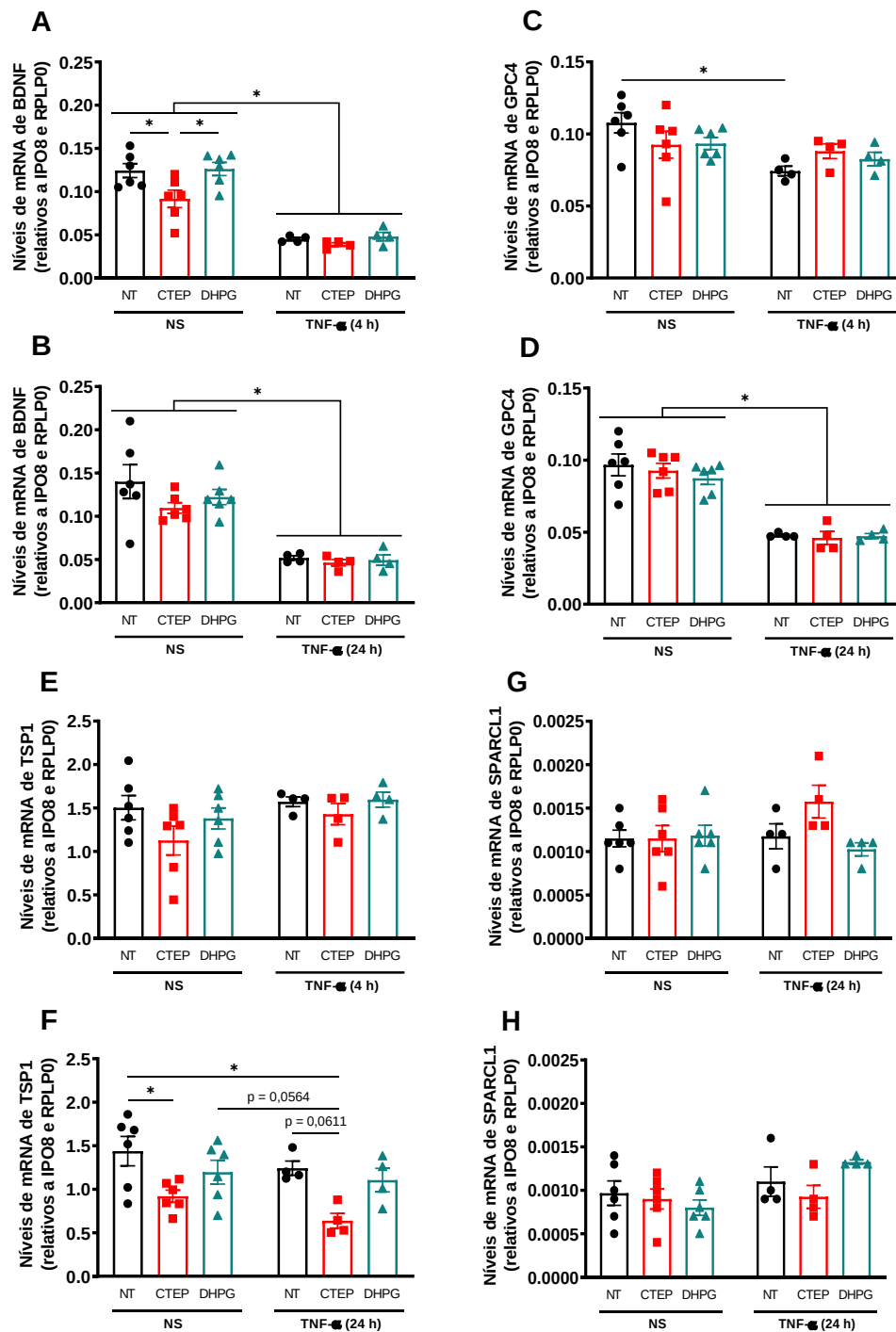


Figura 15. CTEP e rTNF- α diminuem a expressão de moléculas sinaptogênicas. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *BDNF* (A e B), glipican-4 (*GPC4*) (C e D), trombospondina-1 (*TSP1*) (E e F) e proteína 1 semelhante à SPARC (*SPARCL1*) (G e H) em astrócitos derivados de hiPSCs que não foram estimulados (NS) ou foram estimulados com rTNF- α (10 ng/mL) e tratados com veículo (NT), CTEP (10 μ M) ou DHPG (10 μ M) por 4 h (A, C, E e G) ou 24 h (B, D, F e H). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicatas e normalizado pela média dos níveis de mRNA de *RPLP0* e *IPO8*. Os dados representam as médias $\pm$ SEM, $n=4-6$. * ($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significativas.

5. DISCUSSÃO

Processos inflamatórios têm sido associados com a etiopatologia de diversos distúrbios neurológicos, sendo continuamente identificados como fatores preponderantes inclusive em doenças que não são tradicionalmente consideradas de origem neuroinflamatória (Gilhus; Deuschl, 2019). O mGluR5 está envolvido em processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos, sendo considerado um alvo farmacológico promissor para promoção da neuroproteção em distúrbios neurológicos (Spampinato *et al.*, 2018). Entretanto o papel do mGluR5 em astrócitos em contextos patológicos ainda é pouco estudado, havendo dados conflitantes na literatura, sugerindo que a ativação desse receptor pode resultar tanto em efeitos protetores quanto tóxicos, dependendo do contexto. Enquanto alguns estudos relataram efeitos benéficos da ativação do mGluR5 em astrócitos após lesões, atribuídos à liberação de fatores de crescimento e moléculas sinaptogênicas (Fulmer *et al.*, 2014; Saitta *et al.*, 2021), outros estudos indicam que a ativação desse receptor pode ser prejudicial, levando à produção de mediadores inflamatórios e à degeneração astrocitária (Rossi *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2012). De fato, a eficácia de agonistas ou antagonistas do mGluR5 pode variar dependendo da condição patológica subjacente. Por exemplo, a estimulação do mGluR5 em astrócitos pode promover a liberação de BDNF, que promove a síntese de proteínas de mielina em um modelo de desmielinização induzido por cuprizona (Saitta *et al.*, 2021). Por outro lado, no caso da DA, a presença de A β leva ao aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ nos astrócitos, um efeito exacerbado pela expressão aumentada do mGluR5 nessas células (Casley *et al.*, 2009; Grolla; Fakhfour; *et al.*, 2013; Grolla; Sim; *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Shrivastava *et al.*, 2013). Nesse cenário, o antagonismo do mGluR5 mostrou-se eficaz em reverter o aumento de Ca²⁺, prevenindo a disfunção dessa sinalização induzida pelo A β (Casley *et al.*, 2009; Grolla; Fakhfour; *et al.*, 2013). Adicionalmente, demonstrou-se que o bloqueio do mGluR5 em astrócitos previne a morte celular em um modelo de ELA (Rossi *et al.*, 2008). Essas evidências ressaltam o papel dual do mGluR5 em diferentes contextos patológicos.

Os resultados apresentados nesse trabalho podem contribuir para elucidar essa ambivalência, já que demonstramos que o bloqueio do mGluR5 por CTEP diminuiu os níveis de TNF- α e IL-6 após estimulação curta por rTNF- α , observando-se a perda da intensidade desse efeito em 24 horas. Estes achados corroboram

estudos anteriores, mostrando que o antagonismo do mGluR5 previne a secreção de fatores inflamatórios em uma linhagem celular de astrócitos (Shah *et al.*, 2012). O mGluR5 pode mediar a ativação de vias envolvidas na produção de fatores inflamatórios, tais como NF- κ B, JNKs e o fator de transcrição dependente de calcineurina NFAT (Wang; Zhuo, 2012; Furman; Norris, 2014; Abd-Elrahman; Ferguson, 2022). Dessa forma, a modulação dessas vias pode estar envolvida na redução da produção de citocinas observada diante da inibição de mGluR5 por CTEP. Experimentos envolvendo a avaliação da translocação nuclear de NF- κ B, a quantificação da fosforilação de proteínas envolvidas nessas vias e o uso de fármacos para inibição da atividade dessas proteínas são essenciais para verificar essa hipótese. Uma possível limitação da análise conduzida é que a presença de rTNF- α residual poderia interferir na detecção do TNF- α secretado. No entanto, a avaliação dos transcritos de mRNA de TNF- α demonstrou um aumento na expressão desse gene após a estimulação com rTNF- α , corroborando os achados da quantificação proteica. É importante distinguir os componentes utilizados para as análises proteicas e de mRNA. Enquanto as análises proteicas foram feitas utilizando o sobrenadante das células tratadas, as análises de qPCR foram feitas a partir da extração do RNA total da monocamada celular, o que explica as diferenças encontradas entre os dados obtidos nessas análises. Embora o CTEP tenha reduzido a secreção de citocinas, é interessante notar que ele aumentou a expressão gênica de *SERPINA3*, que é um marcador de astrócitos reativos.

A fagocitose desempenha um papel fundamental na remoção de células mortas tanto em condições fisiológicas quanto patológicas no SNC. Esse processo também é crucial para a eliminação de sinapses, refinando as redes neurais durante o desenvolvimento e na vida adulta (Trachtenberg *et al.*, 2002; Paolicelli *et al.*, 2011). No entanto, a fagocitose aberrante de sinapses por micróglias tem sido implicada como um mecanismo central na perda sináptica observada na DA (Hong *et al.*, 2016). Embora as micróglias sejam amplamente conhecidas por sua capacidade fagocítica, os astrócitos também podem fagocitar sinapses no cérebro em desenvolvimento e remover agregados proteicos extracelulares, como o A β (Koistinaho *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2013). Notavelmente, descobertas recentes indicam que as sinapses hipocâmpais são preferencialmente fagocitadas por astrócitos (Lee *et al.*, 2021). Ademais, observou-se, em um modelo murino da DA, que astrócitos associados ao A β fagocitam sinapses disfuncionais, enquanto as micróglias não desempenham essa

função (Gomez-Arboledas *et al.*, 2018). Contudo, essa atividade benéfica é limitada, já que, à medida que o A β se acumula, a capacidade dos astrócitos de fagocitar sinapses distróficas é prejudicada e a expressão dos receptores fagocíticos *MERTK* e *MEGF10* diminui (Iram *et al.*, 2016; Sanchez-Mico *et al.*, 2021). Embora as sinapses saudáveis devam ser preservadas, esse acúmulo de sinapses defeituosas pode criar um ambiente sináptico disfuncional, levando ao agravamento da condição patológica (Sanchez-Mico *et al.*, 2021). Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que rTNF- α aumentou o índice de fagocitose dos astrócitos. O tratamento com esse estímulo inflamatório também aumentou a expressão da cadeia α V, codificada por *ITGAV* e parte do receptor fagocítico integrina α V β 3/5, enquanto a expressão de *MERTK* foi reduzida. De modo interessante, a estimulação com rTNF- α diminuiu a expressão da subunidade β 5 da integrina α V β 3/5, codificada por *ITGB5*, indicando que o aumento na fagocitose pode ser mediado pelo heterodímero formado pela cadeia α e a cadeia β 3. Em oposição, um trabalho anterior mostrou que astrócitos A1 murinos quando expostos a estímulos inflamatórios (IL-1 α , TNF- α e C1q) exibem uma atividade fagocítica reduzida para sinapses e mielina e uma redução na expressão dos receptores fagocíticos *MERTK* e *MEGF10* (Liddelow *et al.*, 2017). Assim, esses resultados indicam que diferentes combinações de fatores inflamatórios podem modular a atividade fagocítica dos astrócitos de maneiras distintas. Esses dados evidenciam, portanto, que a classificação simplificada de astrócitos em subtipos A1 e A2 pode não capturar plenamente a complexidade dos fenótipos astrocitários que parecem ser tão diversos quanto os estímulos capazes de induzir reatividade (Escartin *et al.*, 2021).

Poucos estudos têm explorado o papel do mGluR5 na fagocitose mediada por astrócitos. Um estudo recente demonstrou que um modulador alostérico silencioso do mGluR5 impede a localização sináptica do componente 1q do complemento (C1q) e a fagocitose dessas terminações por astrócitos em um modelo murino da DA (Spurrier *et al.*, 2022). Os resultados do presente trabalho demonstraram que o tratamento com CTEP aumentou a fagocitose tanto na presença quanto na ausência de rTNF- α . É intrigante que o DHPG tenha produzido um efeito semelhante ao CTEP na fagocitose astrocitária. De fato, tanto o DHPG quanto o CTEP aumentaram a expressão gênica de *SERPINA3*. É importante mencionar que DHPG ativa tanto o mGluR5 quanto o mGluR1, enquanto CTEP é um agonista inverso que bloqueia especificamente o mGluR5 (Lindemann *et al.*, 2011). Embora a expressão de mGluR5 em astrócitos

diminua após o nascimento e o mGluR1 normalmente não seja expresso por estas células, ambos os receptores têm a expressão aumentada em resposta a lesões (Aronica *et al.*, 2001; Geurts *et al.*, 2003; Gwak; Hulsebosch, 2005; Shrivastava *et al.*, 2013; Iyer *et al.*, 2014). Adicionalmente, nossos dados confirmaram que os astrócitos derivados de hiPSCs expressam tanto mGluR1 quanto mGluR5. Assim, é possível que o aumento na fagocitose e as alterações nos níveis de *SERPINA3* induzidos pelo DHPG se devam à ativação do mGluR1 e que esses dois mGluRs do grupo I tenham funções opostas nos astrócitos. Outra possibilidade é a de que o tratamento com o DHPG tenha causado a dessensibilização do mGluR5, mediada por quinases, seja por internalização desse receptor ou pelo desacoplamento da ativação de proteínas por sua porção C-terminal. Isso explicaria porque os efeitos da ativação de mGluR5 pelo DHPG seguiram a mesma direção de sua inibição por CTEP (Gereau; Heinemann, 1998; Suh *et al.*, 2018). O fato de o DHPG não apresentar esse mesmo efeito no grupo estimulado com TNF- α poderia ser explicado por uma elevação da produção de glutamato provocada por esse mediador imune (Olmos; Llado, 2014). A presença do glutamato pode causar a ativação de receptores do tipo NMDAR nessas células, revertendo a dessensibilização de mGluR5 (Alagarsamy *et al.*, 1999). No entanto, experimentos adicionais são cruciais para esclarecer esses mecanismos, tais como a avaliação dos níveis de glutamato, a análise da atividade de transportadores desse neurotransmissor e ensaios de biotinylation para verificar alterações no tráfego de mGluR5 da membrana celular. Os dados atuais ilustram a complexidade da sinalização dos mGluRs em contextos patológicos. Esses resultados indicam que CTEP tem um efeito significativo na indução da fagocitose, independentemente da presença do estímulo inflamatório. Considerando que a diminuição da fagocitose por micróglia e astrócitos está associada às doenças neurológicas, incluindo a DA (Iram *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2022), o CTEP poderia ser uma opção terapêutica para compensar o prejuízo na remoção fagocítica de A β e sinapses distróficas nessa e em outras proteopatias.

Astrócitos desempenham papéis cruciais na sobrevivência neuronal e na remodelação sináptica, secretando fatores tróficos e sinaptogênicos, incluindo BDNF (Gomez-Casati *et al.*, 2010), GPC4 (Allen *et al.*, 2012), SPARCL1 (Kucukdereli *et al.*, 2011) e TSP (Christopherson *et al.*, 2005). Nossos dados mostraram que a estimulação com rTNF- α diminuiu os níveis de *BDNF* e *GPC4*, sem modificar os níveis de mRNA de *TSP1*. Um estudo anterior demonstrou que astrócitos A1 murinos, sob

diferentes estímulos inflamatórios (IL-1 α , TNF- α e C1q), apresentaram níveis elevados de GPC4 e TSP1/2 (Liddelow *et al.*, 2017). Embora esses resultados contrastantes possam ser explicados por diferenças nos estímulos inflamatórios utilizados, também é possível que astrócitos derivados de hiPSCs e astrócitos murinos respondam de maneira diferente à inflamação, destacando a importância do uso de modelos celulares relevantes para humanos. Notavelmente, embora o CTEP tenha tido um efeito anti-inflamatório, a inibição do mGluR5 não resultou em um aumento na expressão dos fatores sinaptogênicos. Na verdade, o CTEP diminuiu os níveis de expressão de *BDNF* e TSP1. Esses resultados eram esperados, uma vez que foi demonstrado que o mGluR5 astrogliar está envolvido na secreção de GPC4, BDNF e TSP1 (Kim, S. K. *et al.*, 2016; Saitta *et al.*, 2021; Danjo *et al.*, 2022). A ativação do mGluR5 também promove a expressão de *BDNF* por meio do aumento da fosforilação de CREB (Mao; Wang, 2003; Wang; Zhuo, 2012; Doria *et al.*, 2015; Doria *et al.*, 2018). Além disso, dados anteriores de nosso laboratório mostraram que a ablação genética do mGluR5 resulta na redução do número de espinhas dendríticas em um modelo murino de doença de Huntington (De Souza *et al.*, 2022), enquanto a modulação alostérica positiva do mGluR5 é capaz de reverter esse fenótipo (Doria *et al.*, 2018), indicando que a estimulação do mGluR5 promove a sinaptogênese. Assim, tanto o rTNF- α quanto a inibição do mGluR5 podem prejudicar a sinaptogênese e estudos futuros serão cruciais para determinar se o meio condicionado de astrócitos ou a co-cultura desses astrócitos com neurônios levariam a uma redução no número de sinapses em células humanas. Além da utilização de modelos que contenham outros tipos celulares, a quantificação da morte celular em cada grupo, bem como a medição da liberação de cálcio, são experimentos essenciais para elucidar as vias moleculares subjacentes às alterações observadas nesse trabalho em resposta aos tratamentos e estímulos administrados.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, a inibição do mGluR5 por CTEP atenua a secreção de fatores inflamatórios induzida por rTNF- α , embora esse efeito diminua ao longo do tempo. Paralelamente, o tratamento com CTEP não altera a expressão de marcadores de reatividade característicos dos fenótipos A1 ou A2, enquanto a estimulação com rTNF- α resulta em uma elevação da expressão dos marcadores do fenótipo A1. Tanto o tratamento com CTEP quanto com rTNF- α aumentam a expressão de *SERPINA3* e a fagocitose pelos astrócitos, enquanto a expressão de fatores sinaptogênicos é reduzida. Portanto, o tratamento com CTEP pode ser uma opção quando se deseja o aumento da fagocitose, embora isso possa levar a um aumento na poda sináptica e à diminuição da sinaptogênese. Esses dados ilustram a complexidade da farmacologia do mGluR5 e mostram que a classificação simplificada de astrócitos reativos em A1 e A2 não é suficientemente abrangente para capturar sua diversidade fenotípica. Portanto, é imperativa a investigação da reatividade astrocitária em diferentes condições para identificar as propriedades das diversas populações de astrócitos reativos e desenvolver terapias que considerem essa diversidade.

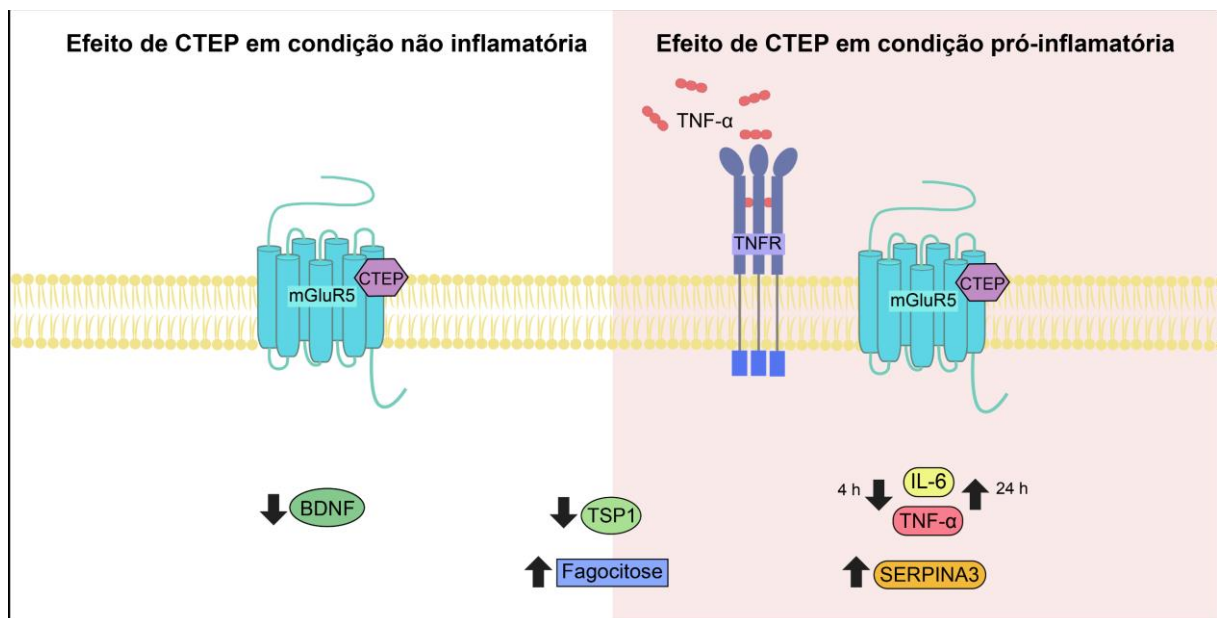


Figura 16. Efeitos do CTEP em astrócitos derivados de hiPSCs sob condição não inflamatória e pró-inflamatória. A ilustração apresenta um resumo dos efeitos da inibição da sinalização de mGluR5 por CTEP em astrócitos derivados de hiPSCs, estimulados ou não com rTNF- α . Na ausência deste estímulo inflamatório a administração de CTEP diminui os níveis de *BDNF*. Já na presença de rTNF- α , CTEP provoca uma diminuição transitória nos níveis de IL-6 e TNF- α , enquanto aumenta os níveis do marcador de reatividade geral *SERPINA3*. CTEP promove a diminuição dos níveis de TSP1 e o aumento da fagocitose, independentemente da presença de rTNF- α . Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABD-ELRAHMAN, K. S.; FERGUSON, S. S. G. Modulation of mTOR and CREB pathways following mGluR5 blockade contribute to improved Huntington's pathology in zQ175 mice. **Mol Brain**, 12, n. 1, p. 35, Apr 8 2019.

ABD-ELRAHMAN, K. S.; FERGUSON, S. S. G. Noncanonical Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling in Alzheimer's Disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 62, p. 235-254, Jan 6 2022.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, 3, n. 9, p. 745-756, Sep 2003.

ALAGARSAMY, S.; MARINO, M. J.; ROUSE, S. T.; GEREAU, R. W. t.; HEINEMANN, S. F.; CONN, P. J. Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. **Nat Neurosci**, 2, n. 3, p. 234-240, Mar 1999.

ALLEN, N. J.; BENNETT, M. L.; FOO, L. C.; WANG, G. X.; CHAKRABORTY, C.; SMITH, S. J.; BARRES, B. A. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. **Nature**, 486, n. 7403, p. 410-414, May 27 2012.

AMIN, R.; QUISPE, C.; DOCEA, A. O.; YDYRYS, A.; KULBAYEVA, M.; DURNA DASTAN, S.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J. The role of Tumour Necrosis Factor in neuroinflammation associated with Parkinson's disease and targeted therapies. **Neurochem Int**, 158, p. 105376, Sep 2022.

ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, 32, n. 1, p. 1-14, Oct 2000.

ANDERSON, M. A.; BURDA, J. E.; REN, Y.; AO, Y.; O'SHEA, T. M.; KAWAGUCHI, R.; COPPOLA, G.; KHAKH, B. S.; DEMING, T. J. *et al.* Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. **Nature**, 532, n. 7598, p. 195-200, Apr 14 2016.

ARONICA, E.; CATANIA, M. V.; GEURTS, J.; YANKAYA, B.; TROOST, D. Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. **Neuroscience**, 105, n. 2, p. 509-520, 2001.

ARONICA, E.; GORTER, J. A.; ROZEMULLER, A. J.; YANKAYA, B.; TROOST, D. Activation of metabotropic glutamate receptor 3 enhances interleukin (IL)-1beta-stimulated release of IL-6 in cultured human astrocytes. **Neuroscience**, 130, n. 4, p. 927-933, 2005.

ATRETKHANY, K. N.; GOGOLEVA, V. S.; DRUTSKAYA, M. S.; NEDOSPASOV, S. A. Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease. **J Leukoc Biol**, 107, n. 6, p. 893-905, Jun 2020.

BALAZS, R.; MILLER, S.; ROMANO, C.; DE VRIES, A.; CHUN, Y.; COTMAN, C. W. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. **J Neurochem**, 69, n. 1, p. 151-163, Jul 1997.

BARON, R.; NEMIROVSKY, A.; HARPAZ, I.; COHEN, H.; OWENS, T.; MONSONEGO, A. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB J**, 22, n. 8, p. 2843-2852, Aug 2008.

BARONE, F. C.; ARVIN, B.; WHITE, R. F.; MILLER, A.; WEBB, C. L.; WILLETTE, R. N.; LYSKO, P. G.; FEUERSTEIN, G. Z. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. **Stroke**, 28, n. 6, p. 1233-1244, Jun 1997.

BARRETTE, B.; HEBERT, M. A.; FILALI, M.; LAFORTUNE, K.; VALLIERES, N.; GOWING, G.; JULIEN, J. P.; LACROIX, S. Requirement of myeloid cells for axon regeneration. **J Neurosci**, 28, n. 38, p. 9363-9376, Sep 17 2008.

BATIUK, M. Y.; MARTIROSYAN, A.; WAHIS, J.; DE VIN, F.; MARNEFFE, C.; KUSSEROW, C.; KOEPPEN, J.; VIANA, J. F.; OLIVEIRA, J. F. *et al.* Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 1220, Mar 5 2020.

BAYRAKTAR, O. A.; BARTELS, T.; HOLMQVIST, S.; KLESHCHEVNIKOV, V.; MARTIROSYAN, A.; POLIOUDAKIS, D.; BEN HAIM, L.; YOUNG, A. M. H.; BATIUK, M. Y. *et al.* Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. **Nat Neurosci**, 23, n. 4, p. 500-509, Apr 2020.

BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 1, p. 49-59, Jan 2017.

BEN HAIM, L.; ROWITCH, D. H. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. **Nat Rev Neurosci**, 18, n. 1, p. 31-41, Jan 2017.

BENQUET, P.; GEE, C. E.; GERBER, U. Two distinct signaling pathways upregulate NMDA receptor responses via two distinct metabotropic glutamate receptor subtypes. **J Neurosci**, 22, n. 22, p. 9679-9686, Nov 15 2002.

BRAMBILLA, R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathol**, 137, n. 5, p. 757-783, May 2019a.

BRAMBILLA, R. Neuroinflammation, the thread connecting neurological disease : Cluster: "Neuroinflammatory mechanisms in neurodegenerative disorders". **Acta Neuropathol**, 137, n. 5, p. 689-691, May 2019b.

BYRNES, K. R.; STOICA, B.; LOANE, D. J.; RICCIO, A.; DAVIS, M. I.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. **Glia**, 57, n. 5, p. 550-560, Apr 1 2009.

CAI, Z.; SCHOOLS, G. P.; KIMELBERG, H. K. Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. **Glia**, 29, n. 1, p. 70-80, Jan 1 2000.

CAMERON, E. G.; NAHMOU, M.; TOTH, A. B.; HEO, L.; TANASA, B.; DALAL, R.; YAN, W.; NALLAGATLA, P.; XIA, X. *et al.* A molecular switch for neuroprotective astrocyte reactivity. **Nature**, 626, n. 7999, p. 574-582, Feb 2024.

CANTONI, C.; BOLLMAN, B.; LICASTRO, D.; XIE, M.; MIKESELL, R.; SCHMIDT, R.; YUEDE, C. M.; GALIMBERTI, D.; OLIVECRONA, G. *et al.* TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo. **Acta Neuropathol**, 129, n. 3, p. 429-447, Mar 2015.

CARDOZO, P. L.; DE LIMA, I. B. Q.; MACIEL, E. M. A.; SILVA, N. C.; DOBRANSKY, T.; RIBEIRO, F. M. Synaptic Elimination in Neurological Disorders. **Curr Neuropharmacol**, 17, n. 11, p. 1071-1095, 2019.

CASLEY, C. S.; LAKICS, V.; LEE, H. G.; BROAD, L. M.; DAY, T. A.; CLUETT, T.; SMITH, M. A.; O'NEILL, M. J.; KINGSTON, A. E. Up-regulation of astrocyte metabotropic glutamate receptor 5 by amyloid-beta peptide. **Brain Res**, 1260, p. 65-75, Mar 13 2009.

CHAKRABARTY, P.; HERRING, A.; CEBALLOS-DIAZ, C.; DAS, P.; GOLDE, T. E. Hippocampal expression of murine TNFalpha results in attenuation of amyloid deposition in vivo. **Mol Neurodegener**, 6, p. 16, Feb 16 2011.

CHAKRABARTY, P.; JANSEN-WEST, K.; BECCARD, A.; CEBALLOS-DIAZ, C.; LEVITES, Y.; VERBEECK, C.; ZUBAIR, A. C.; DICKSON, D.; GOLDE, T. E. *et al.* Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. **FASEB J**, 24, n. 2, p. 548-559, Feb 2010.

CHAMORRO, A.; MEISEL, A.; PLANAS, A. M.; URRÁ, X.; VAN DE BEEK, D.; VELTKAMP, R. The immunology of acute stroke. **Nat Rev Neurol**, 8, n. 7, p. 401-410, Jun 5 2012.

CHENG, X.; YANG, L.; HE, P.; LI, R.; SHEN, Y. Differential activation of tumor necrosis factor receptors distinguishes between brains from Alzheimer's disease and non-demented patients. **J Alzheimers Dis**, 19, n. 2, p. 621-630, 2010.

CHRISTOPHERSON, K. S.; ULLIAN, E. M.; STOKES, C. C.; MULLOWNEY, C. E.; HELL, J. W.; AGAH, A.; LAWLER, J.; MOSHER, D. F.; BORNSTEIN, P. *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, 120, n. 3, p. 421-433, Feb 11 2005.

CHUNG, W. S.; CLARKE, L. E.; WANG, G. X.; STAFFORD, B. K.; SHER, A.; CHAKRABORTY, C.; JOUNG, J.; FOO, L. C.; THOMPSON, A. *et al.* Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. **Nature**, 504, n. 7480, p. 394-400, Dec 19 2013.

CLARKE, L. E.; LIDDELOW, S. A.; CHAKRABORTY, C.; MUNCH, A. E.; HEIMAN, M.; BARRES, B. A. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 8, p. E1896-E1905, Feb 20 2018.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 37, p. 205-237, 1997.

D'ASCENZO, M.; FELLIN, T.; TERUNUMA, M.; REVILLA-SANCHEZ, R.; MEANEY, D. F.; AUBERSON, Y. P.; MOSS, S. J.; HAYDON, P. G. mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 6, p. 1995-2000, Feb 6 2007.

DANJO, Y.; SHIGETOMI, E.; HIRAYAMA, Y. J.; KOBAYASHI, K.; ISHIKAWA, T.; FUKAZAWA, Y.; SHIBATA, K.; TAKANASHI, K.; PARAJULI, B. *et al.* Transient astrocytic mGluR5 expression drives synaptic plasticity and subsequent chronic pain in mice. **J Exp Med**, 219, n. 4, Apr 4 2022.

DE SOUZA, J. M.; ABD-ELRAHMAN, K. S.; RIBEIRO, F. M.; FERGUSON, S. S. G. mGluR5 regulates REST/NRSF signaling through N-cadherin/beta-catenin complex in Huntington's disease. **Mol Brain**, 13, n. 1, p. 118, Aug 28 2020.

DE SOUZA, J. M.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; MACIEL, E. M. A.; SILVA, N. C.; LIMA, I. B. Q.; DORIA, J. G.; OLMO, I. G.; RIBEIRO, F. M. mGluR5 ablation leads to age-related synaptic plasticity impairments and does not improve Huntington's disease phenotype. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 8982, May 28 2022.

DING, C.; WU, Y.; CHEN, X.; CHEN, Y.; WU, Z.; LIN, Z.; KANG, D.; FANG, W.; CHEN, F. Global, regional, and national burden and attributable risk factors of neurological disorders: The Global Burden of Disease study 1990-2019. **Front Public Health**, 10, p. 952161, 2022.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, 51, n. 1, p. 7-61, Mar 1999.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem**, 139 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 136-153, Oct 2016.

DONG, W.; TODD, A. C.; BROER, A.; HULME, S. R.; BROER, S.; BILLUPS, B. PKC-Mediated Modulation of Astrocyte SNAT3 Glutamine Transporter Function at Synapses in Situ. **Int J Mol Sci**, 19, n. 4, Mar 21 2018.

DORIA, J. G.; DE SOUZA, J. M.; ANDRADE, J. N.; RODRIGUES, H. A.; GUIMARAES, I. M.; CARVALHO, T. G.; GUATIMOSIM, C.; DOBRANSKY, T.; RIBEIRO, F. M. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, 73, p. 163-173, Jan 2015.

DORIA, J. G.; DE SOUZA, J. M.; SILVA, F. R.; OLMO, I. G.; CARVALHO, T. G.; ALVES-SILVA, J.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; SANTOS, J. T.; XAVIER, C. Q. S. *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.

ENDO, F.; KASAI, A.; SOTO, J. S.; YU, X.; QU, Z.; HASHIMOTO, H.; GRADINARU, V.; KAWAGUCHI, R.; KHAKH, B. S. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease. **Science**, 378, n. 6619, p. eadc9020, Nov 4 2022.

EROGLU, C.; ALLEN, N. J.; SUSMAN, M. W.; O'ROURKE, N. A.; PARK, C. Y.; OZKAN, E.; CHAKRABORTY, C.; MULINYAWE, S. B.; ANNIS, D. S. *et al.* Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. **Cell**, 139, n. 2, p. 380-392, Oct 16 2009.

ESCARTIN, C.; GALEA, E.; LAKATOS, A.; O'CALLAGHAN, J. P.; PETZOLD, G. C.; SERRANO-POZO, A.; STEINHAUSER, C.; VOLTERRA, A.; CARMIGNOTO, G. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nat Neurosci**, 24, n. 3, p. 312-325, Mar 2021.

FEIGIN, V. L.; ABAJOBIR, A. A.; ABATE, K. H.; ABD-ALLAH, F.; ABDULLE, A. M.; ABERA, S. F.; ABYU, G. Y.; AHMED, M. B.; AICHOOR, A. N. *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet Neurol**, 16, n. 11, p. 877-897, Nov 2017.

FEIGIN, V. L.; NICHOLS, E.; ALAM, T.; BANNICK, M. S.; BEGHI, E.; BLAKE, N.; CULPEPPER, W. J.; DORSEY, E. R.; ELBAZ, A. *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol**, 18, n. 5, p. 459-480, May 2019.

FEIGIN, V. L.; VOS, T.; NICHOLS, E.; OWOLABI, M. O.; CARROLL, W. M.; DICHGANS, M.; DEUSCHL, G.; PARMAR, P.; BRAININ, M. *et al.* The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. **Lancet Neurol**, 19, n. 3, p. 255-265, Mar 2020.

FONTAINE, V.; MOHAND-SAID, S.; HANOTEAU, N.; FUCHS, C.; PFIZENMAIER, K.; EISEL, U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. **J Neurosci**, 22, n. 7, p. RC216, Apr 1 2002.

FULMER, C. G.; VONDRAN, M. W.; STILLMAN, A. A.; HUANG, Y.; HEMPSTEAD, B. L.; DREYFUS, C. F. Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. **J Neurosci**, 34, n. 24, p. 8186-8196, Jun 11 2014.

FURMAN, J. L.; NORRIS, C. M. Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond. **J Neuroinflammation**, 11, p. 158, Sep 10 2014.

GALLOWAY, D. A.; PHILLIPS, A. E. M.; OWEN, D. R. J.; MOORE, C. S. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. **Front Immunol**, 10, p. 790, 2019.

GERBER, U.; GEE, C. E.; BENQUET, P. Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. **Curr Opin Pharmacol**, 7, n. 1, p. 56-61, Feb 2007.

GEREAU, R. W. t.; HEINEMANN, S. F. Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. **Neuron**, 20, n. 1, p. 143-151, Jan 1998.

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

GILHUS, N. E.; DEUSCHL, G. Neuroinflammation - a common thread in neurological disorders. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 8, p. 429-430, Aug 2019.

GOMEZ-ARBOLEDAS, A.; DAVILA, J. C.; SANCHEZ-MEJIAS, E.; NAVARRO, V.; NUNEZ-DIAZ, C.; SANCHEZ-VARO, R.; SANCHEZ-MICO, M. V.; TRUJILLO-ESTRADA, L.; FERNANDEZ-VALENZUELA, J. J. *et al.* Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. **Glia**, 66, n. 3, p. 637-653, Mar 2018.

GOMEZ-CASATI, M. E.; MURTIE, J. C.; RIO, C.; STANKOVIC, K.; LIBERMAN, M. C.; CORFAS, G. Nonneuronal cells regulate synapse formation in the vestibular sensory epithelium via erbB-dependent BDNF expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 39, p. 17005-17010, Sep 28 2010.

GONZALEZ CALDITO, N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. **Front Immunol**, 14, p. 1213448, 2023.

GOUGH, P.; MYLES, I. A. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. **Front Immunol**, 11, p. 585880, 2020.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 6, p. 393-407, Jun 2009.

GROLLA, A. A.; FAKHFOURI, G.; BALZARETTI, G.; MARCELLO, E.; GARDONI, F.; CANONICO, P. L.; DILUCA, M.; GENAZZANI, A. A.; LIM, D. Abeta leads to Ca(2)(+) signaling alterations and transcriptional changes in glial cells. **Neurobiol Aging**, 34, n. 2, p. 511-522, Feb 2013.

GROLLA, A. A.; SIM, J. A.; LIM, D.; RODRIGUEZ, J. J.; GENAZZANI, A. A.; VERKHRATSKY, A. Amyloid-beta and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. **Cell Death Dis**, 4, p. e623, May 9 2013.

GUTTENPLAN, K. A.; WEIGEL, M. K.; PRAKASH, P.; WIJEWARDHANE, P. R.; HASEL, P.; RUFEN-BLANCHETTE, U.; MUNCH, A. E.; BLUM, J. A.; FINE, J. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. **Nature**, 599, n. 7883, p. 102-107, Nov 2021.

GWAK, Y. S.; HULSEBOSCH, C. E. Upregulation of Group I metabotropic glutamate receptors in neurons and astrocytes in the dorsal horn following spinal cord injury. **Exp Neurol**, 195, n. 1, p. 236-243, Sep 2005.

HAMPEL, H.; HARDY, J.; BLENNOW, K.; CHEN, C.; PERRY, G.; KIM, S. H.; VILLEMAGNE, V. L.; AISEN, P.; VENDRUSCOLO, M. *et al.* The Amyloid-beta Pathway in Alzheimer's Disease. **Mol Psychiatry**, 26, n. 10, p. 5481-5503, Oct 2021.

HAN, X.; CHEN, M.; WANG, F.; WINDREM, M.; WANG, S.; SHANZ, S.; XU, Q.; OBERHEIM, N. A.; BEKAR, L. *et al.* Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. **Cell Stem Cell**, 12, n. 3, p. 342-353, Mar 7 2013.

HASEL, P.; DANDO, O.; JIWAJI, Z.; BAXTER, P.; TODD, A. C.; HERON, S.; MARKUS, N. M.; MCQUEEN, J.; HAMPTON, D. W. *et al.* Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. **Nat Commun**, 8, p. 15132, May 2 2017.

HE, P.; ZHONG, Z.; LINDHOLM, K.; BERNING, L.; LEE, W.; LEMERE, C.; STAUFENBIEL, M.; LI, R.; SHEN, Y. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. **J Cell Biol**, 178, n. 5, p. 829-841, Aug 27 2007.

HENKEL, J. S.; BEERS, D. R.; ZHAO, W.; APPEL, S. H. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. **J Neuroimmune Pharmacol**, 4, n. 4, p. 389-398, Dec 2009.

HONG, S.; BEJA-GLASSER, V. F.; NFONYOIM, B. M.; FROUIN, A.; LI, S.; RAMAKRISHNAN, S.; MERRY, K. M.; SHI, Q.; ROSENTHAL, A. *et al.* Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. **Science**, 352, n. 6286, p. 712-716, May 6 2016.

HOSLI, L.; ZUEND, M.; BREDELL, G.; ZANKER, H. S.; PORTO DE OLIVEIRA, C. E.; SAAB, A. S.; WEBER, B. Direct vascular contact is a hallmark of cerebral astrocytes. **Cell Rep**, 39, n. 1, p. 110599, Apr 5 2022.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell**, 81, n. 4, p. 495-504, May 19 1995.

IMITOLA, J.; RADDASSI, K.; PARK, K. I.; MUELLER, F. J.; NIETO, M.; TENG, Y. D.; FRENKEL, D.; LI, J.; SIDMAN, R. L. *et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 52, p. 18117-18122, Dec 28 2004.

IRAM, T.; TRUDLER, D.; KAIN, D.; KANNER, S.; GALRON, R.; VASSAR, R.; BARZILAI, A.; BLINDER, P.; FISHELSON, Z. *et al.* Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Abeta uptake and in neuroprotection. **Neurobiol Dis**, 96, p. 84-94, Dec 2016.

ITO, I.; KOHDA, A.; TANABE, S.; HIROSE, E.; HAYASHI, M.; MITSUNAGA, S.; SUGIYAMA, H. 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. **Neuroreport**, 3, n. 11, p. 1013-1016, Nov 1992.

IYER, A. M.; VAN SCHEPPINGEN, J.; MILENKOVIC, I.; ANINK, J. J.; LIM, D.; GENAZZANI, A. A.; ADLE-BIASSETTE, H.; KOVACS, G. G.; ARONICA, E. Metabotropic glutamate receptor 5 in Down's syndrome hippocampus during development: increased expression in astrocytes. **Curr Alzheimer Res**, 11, n. 7, p. 694-705, 2014.

JANELSINS, M. C.; MASTRANGELO, M. A.; PARK, K. M.; SUDOL, K. L.; NARROW, W. C.; ODDO, S.; LAFERLA, F. M.; CALLAHAN, L. M.; FEDEROFF, H. J. *et al.* Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- α expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. **Am J Pathol**, 173, n. 6, p. 1768-1782, Dec 2008.

JO, M.; KIM, J. H.; SONG, G. J.; SEO, M.; HWANG, E. M.; SUK, K. Astrocytic Orosomucoid-2 Modulates Microglial Activation and Neuroinflammation. **J Neurosci**, 37, n. 11, p. 2878-2894, Mar 15 2017.

KERNER, J. A.; STANDAERT, D. G.; PENNEY, J. B., Jr.; YOUNG, A. B.; LANDWEHRMEYER, G. B. Expression of group one metabotropic glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified neurons in the rat neostriatum, neocortex, and hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**, 48, n. 2, p. 259-269, Sep 1997.

KIM, H.; WOO, J. H.; LEE, J. H.; JOE, E. H.; JOU, I. 22(R)-hydroxycholesterol induces HuR-dependent MAP kinase phosphatase-1 expression via mGluR5-mediated Ca^{2+} /PKC α signaling. **Biochim Biophys Acta**, 1859, n. 8, p. 1056-1070, Aug 2016.

KIM, R. Y.; HOFFMAN, A. S.; ITOH, N.; AO, Y.; SPENCE, R.; SOFRONIEW, M. V.; VOSKUHL, R. R. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, 274, n. 1-2, p. 53-61, Sep 15 2014.

KIM, S.; STEELMAN, A. J.; KOITO, H.; LI, J. Astrocytes promote TNF-mediated toxicity to oligodendrocyte precursors. **J Neurochem**, 116, n. 1, p. 53-66, Jan 2011.

KIM, S. K.; HAYASHI, H.; ISHIKAWA, T.; SHIBATA, K.; SHIGETOMI, E.; SHINOZAKI, Y.; INADA, H.; ROH, S. E.; KIM, S. J. *et al.* Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. **J Clin Invest**, 126, n. 5, p. 1983-1997, May 2 2016.

KISS, M. G.; MINDUR, J. E.; YATES, A. G.; LEE, D.; FULLARD, J. F.; ANZAI, A.; POLLER, W. C.; CHRISTIE, K. A.; IWAMOTO, Y. *et al.* Interleukin-3 coordinates glial-peripheral immune crosstalk to incite multiple sclerosis. **Immunity**, 56, n. 7, p. 1502-1514 e1508, Jul 11 2023.

KLEIN, R. S.; GARBER, C.; HOWARD, N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. **Nat Immunol**, 18, n. 2, p. 132-141, Feb 2017.

KLEIN, R. S.; HUNTER, C. A. Protective and Pathological Immunity during Central Nervous System Infections. **Immunity**, 46, n. 6, p. 891-909, Jun 20 2017.

KOISTINAHO, M.; LIN, S.; WU, X.; ESTERMAN, M.; KOGER, D.; HANSON, J.; HIGGS, R.; LIU, F.; MALKANI, S. *et al.* Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. **Nat Med**, 10, n. 7, p. 719-726, Jul 2004.

KONISHI, H.; KOIZUMI, S.; KIYAMA, H. Phagocytic astrocytes: Emerging from the shadows of microglia. **Glia**, 70, n. 6, p. 1009-1026, Jun 2022.

KONO, R.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Phagocytic Glial Cells in Brain Homeostasis. **Cells**, 10, n. 6, May 29 2021.

KOTTER, M. R.; SETZU, A.; SIM, F. J.; VAN ROOIJEN, N.; FRANKLIN, R. J. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination. **Glia**, 35, n. 3, p. 204-212, Sep 2001.

KUCUKDERELI, H.; ALLEN, N. J.; LEE, A. T.; FENG, A.; OZLU, M. I.; CONATSER, L. M.; CHAKRABORTY, C.; WORKMAN, G.; WEAVER, M. *et al.* Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 32, p. E440-449, Aug 9 2011.

KUMAR, V.; FAHEY, P. G.; JONG, Y. J.; RAMANAN, N.; O'MALLEY, K. L. Activation of intracellular metabotropic glutamate receptor 5 in striatal neurons leads to up-regulation of genes associated with sustained synaptic transmission including Arc/Arg3.1 protein. **J Biol Chem**, 287, n. 8, p. 5412-5425, Feb 17 2012.

KWART, D.; GREGG, A.; SCHECKEL, C.; MURPHY, E. A.; PAQUET, D.; DUFFIELD, M.; FAK, J.; OLSEN, O.; DARNELL, R. B. *et al.* A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP beta-CTFs, Not Abeta. **Neuron**, 104, n. 2, p. 256-270 e255, Oct 23 2019.

L'EPISCOPO, F.; TIROLO, C.; TESTA, N.; CANIGLIA, S.; MORALE, M. C.; COSSETTI, C.; D'ADAMO, P.; ZARDINI, E.; ANDREONI, L. *et al.* Reactive astrocytes and Wnt/beta-catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, 41, n. 2, p. 508-527, Feb 2011.

LAMBERTSEN, K. L.; FINSEN, B.; CLAUSEN, B. H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? **Acta Neuropathol**, 137, n. 5, p. 693-714, May 2019.

LAMPRON, A.; LAROCHELLE, A.; LAFLAMME, N.; PREFONTAINE, P.; PLANTE, M. M.; SANCHEZ, M. G.; YONG, V. W.; STYS, P. K.; TREMBLAY, M. E. *et al.* Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. **J Exp Med**, 212, n. 4, p. 481-495, Apr 6 2015.

LEE, H. G.; LEE, J. H.; FLAUSINO, L. E.; QUINTANA, F. J. Neuroinflammation: An astrocyte perspective. **Sci Transl Med**, 15, n. 721, p. eadi7828, Nov 8 2023.

LEE, J. H.; KIM, J. Y.; NOH, S.; LEE, H.; LEE, S. Y.; MUN, J. Y.; PARK, H.; CHUNG, W. S. Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. **Nature**, 590, n. 7847, p. 612-617, Feb 2021.

LEI, C.; WU, B.; CAO, T.; LIU, M.; HAO, Z. Brain recovery mediated by toll-like receptor 4 in rats after intracerebral hemorrhage. **Brain Res**, 1632, p. 1-8, Feb 1 2016.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nat Rev Neurol**, 17, n. 3, p. 157-172, Mar 2021.

LENG, K.; ROSE, I. V. L.; KIM, H.; XIA, W.; ROMERO-FERNANDEZ, W.; ROONEY, B.; KOONTZ, M.; LI, E.; AO, Y. *et al.* CRISPRi screens in human iPSC-derived astrocytes elucidate regulators of distinct inflammatory reactive states. **Nat Neurosci**, 25, n. 11, p. 1528-1542, Nov 2022.

LI, J.; PAN, L.; PEMBROKE, W. G.; REXACH, J. E.; GODOY, M. I.; CONDRIO, M. C.; ALVARADO, A. G.; HARTENI, M.; CHEN, Y. W. *et al.* Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 3958, Jun 25 2021.

LI, W.; WU, J.; ZENG, Y.; ZHENG, W. Neuroinflammation in epileptogenesis: from pathophysiology to therapeutic strategies. **Front Immunol**, 14, p. 1269241, 2023.

LIBERTO, C. M.; ALBRECHT, P. J.; HERX, L. M.; YONG, V. W.; LEVISON, S. W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **J Neurochem**, 89, n. 5, p. 1092-1100, Jun 2004.

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

LIM, D.; IYER, A.; RONCO, V.; GROLLA, A. A.; CANONICO, P. L.; ARONICA, E.; GENAZZANI, A. A. Amyloid beta deregulates astroglial mGluR5-mediated calcium signaling via calcineurin and Nf-kB. **Glia**, 61, n. 7, p. 1134-1145, Jul 2013.

LIM, D.; TAPELLA, L.; DEMATTEIS, G.; TALMON, M.; GENAZZANI, A. A. Calcineurin Signalling in Astrocytes: From Pathology to Physiology and Control of Neuronal Functions. **Neurochem Res**, 48, n. 4, p. 1077-1090, Apr 2023.

LINDEMANN, L.; JAESCHKE, G.; MICHALON, A.; VIEIRA, E.; HONER, M.; SPOOREN, W.; PORTER, R.; HARTUNG, T.; KOLCZEWSKI, S. *et al.* CTEP: a novel, potent, long-acting, and orally bioavailable metabotropic glutamate receptor 5 inhibitor. **J Pharmacol Exp Ther**, 339, n. 2, p. 474-486, Nov 2011.

LIU, R.; WANG, J.; CHEN, Y.; COLLIER, J. M.; CAPUK, O.; JIN, S.; SUN, M.; MONDAL, S. K.; WHITESIDE, T. L. *et al.* NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration. **Cell Death Dis**, 13, n. 4, p. 371, Apr 19 2022.

LOANE, D. J.; KUMAR, A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. **Exp Neurol**, 275 Pt 3, n. 0 3, p. 316-327, Jan 2016.

LOANE, D. J.; STOICA, B. A.; PAJOOHESH-GANJI, A.; BYRNES, K. R.; FADEN, A. I. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. **J Biol Chem**, 284, n. 23, p. 15629-15639, Jun 5 2009.

LU, W. Y.; XIONG, Z. G.; LEI, S.; ORSER, B. A.; DUDEK, E.; BROWNING, M. D.; MACDONALD, J. F. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. **Nat Neurosci**, 2, n. 4, p. 331-338, Apr 1999.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, 23, n. 11, p. 549-555, Nov 2002.

MAO, L.; WANG, J. Q. Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in cultured striatal neurons by metabotropic glutamate receptor subtype 5. **J Neurochem**, 84, n. 2, p. 233-243, Jan 2003.

MARINA, N.; CHRISTIE, I. N.; KORSACK, A.; DORONIN, M.; BRAZHE, A.; HOSFORD, P. S.; WELLS, J. A.; SHEIKHBAHAEL, S.; HUMOUD, I. *et al.* Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 131, Jan 9 2020.

MAWUENYEGA, K. G.; SIGURDSON, W.; OVOD, V.; MUNSELL, L.; KASTEN, T.; MORRIS, J. C.; YARASHESKI, K. E.; BATEMAN, R. J. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. **Science**, 330, n. 6012, p. 1774, Dec 24 2010.

MAYO, L.; TRAUGER, S. A.; BLAIN, M.; NADEAU, M.; PATEL, B.; ALVAREZ, J. I.; MASCANFRONI, I. D.; YESTE, A.; KIVISAKK, P. *et al.* Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. **Nat Med**, 20, n. 10, p. 1147-1156, Oct 2014.

MCALPINE, C. S.; PARK, J.; GRICIUC, A.; KIM, E.; CHOI, S. H.; IWAMOTO, Y.; KISS, M. G.; CHRISTIE, K. A.; VINEGONI, C. *et al.* Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. **Nature**, 595, n. 7869, p. 701-706, Jul 2021.

MCCOY, M. K.; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **J Neuroinflammation**, 5, p. 45, Oct 17 2008.

MEDLER, J.; WAJANT, H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. **Expert Opin Ther Targets**, 23, n. 4, p. 295-307, Apr 2019.

MERLINI, M.; MEYER, E. P.; ULMANN-SCHULER, A.; NITSCH, R. M. Vascular beta-amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcAbeta mice. **Acta Neuropathol**, 122, n. 3, p. 293-311, Sep 2011.

MI, Y.; QI, G.; VITALI, F.; SHANG, Y.; RAIKES, A. C.; WANG, T.; JIN, Y.; BRINTON, R. D.; GU, H. *et al.* Loss of fatty acid degradation by astrocytic mitochondria triggers neuroinflammation and neurodegeneration. **Nat Metab**, 5, n. 3, p. 445-465, Mar 2023.

MISHRA, A.; BANDOPADHYAY, R.; SINGH, P. K.; MISHRA, P. S.; SHARMA, N.; KHURANA, N. Neuroinflammation in neurological disorders: pharmacotherapeutic targets from bench to bedside. **Metab Brain Dis**, 36, n. 7, p. 1591-1626, Oct 2021.

MOLLA KAZEMIHA, V.; SHOKRGOZAR, M. A.; ARABESTANI, M. R.; SHOJAEI MOGHADAM, M.; AZARI, S.; MALEKI, S.; AMANZADEH, A.; JEDDI TEHRANI, M.; SHOKRI, F. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. **Cytotechnology**, 61, n. 3, p. 117-124, Dec 2009.

NAKANISHI, S. The molecular diversity of glutamate receptors. **Prog Clin Biol Res**, 390, p. 85-98, 1994.

NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, 132, n. Pt 2, p. 288-295, Feb 2009.

NEW, D. R.; MAGGIRWAR, S. B.; EPSTEIN, L. G.; DEWHURST, S.; GELBARD, H. A. HIV-1 Tat induces neuronal death via tumor necrosis factor- α and activation of non-N-methyl-D-aspartate receptors by a NF κ B-independent mechanism. **J Biol Chem**, 273, n. 28, p. 17852-17858, Jul 10 1998.

NOLLE, A.; VAN DIJKEN, I.; WAELTI, C. M.; CALINI, D.; BRYOIS, J.; LEZAN, E.; GOLLING, S.; AUGUSTIN, A.; FOO, L. *et al.* Enrichment of Glial Cells From Human Post-mortem Tissue for Transcriptome and Proteome Analysis Using Immunopanning. **Front Cell Neurosci**, 15, p. 772011, 2021.

NUTMA, E.; WILLISON, H.; MARTINO, G.; AMOR, S. Neuroimmunology - the past, present and future. **Clin Exp Immunol**, 197, n. 3, p. 278-293, Sep 2019.

OBERHEIM, N. A.; TAKANO, T.; HAN, X.; HE, W.; LIN, J. H.; WANG, F.; XU, Q.; WYATT, J. D.; PILCHER, W. *et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J Neurosci**, 29, n. 10, p. 3276-3287, Mar 11 2009.

OLMOS, G.; LLADO, J. Tumor necrosis factor α : a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators Inflamm**, 2014, p. 861231, 2014.

OWOLABI, M. O.; LEONARDI, M.; BASSETTI, C.; JAARSMA, J.; HAWROT, T.; MAKANJUOLA, A. I.; DHAMIJA, R. K.; FENG, W.; STRAUB, V. *et al.* Global synergistic actions to improve brain health for human development. **Nat Rev Neurol**, 19, n. 6, p. 371-383, Jun 2023.

P.A.H.O. The burden of Neurological conditions in the Region of the Americas, 2000-2019. **Pan American Health Organization**, 2021.

PALLE, P.; MONAGHAN, K. L.; MILNE, S. M.; WAN, E. C. K. Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications. **Med Sci (Basel)**, 5, n. 4, Oct 13 2017.

PAOLICELLI, R. C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L.; SCIANNI, M.; PANZANELLI, P.; GIUSTETTO, M.; FERREIRA, T. A.; GUIDUCCI, E. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, 333, n. 6048, p. 1456-1458, Sep 9 2011.

PATANI, R.; HARDINGHAM, G. E.; LIDDELOW, S. A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nat Rev Neurol**, 19, n. 7, p. 395-409, Jul 2023.

PEAVY, R. D.; CONN, P. J. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat cortical glia by stimulation of metabotropic glutamate receptors. **J Neurochem**, 71, n. 2, p. 603-612, Aug 1998.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends Neurosci**, 32, n. 8, p. 421-431, Aug 2009.

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

POLYZOS, A. A.; LEE, D. Y.; DATTA, R.; HAUSER, M.; BUDWORTH, H.; HOLT, A.; MIHALIK, S.; GOLDSCHMIDT, P.; FRANKEL, K. *et al.* Metabolic Reprogramming in Astrocytes Distinguishes Region-Specific Neuronal Susceptibility in Huntington Mice. **Cell Metab**, 29, n. 6, p. 1258-1273 e1211, Jun 4 2019.

PREWITT, C. M.; NIESMAN, I. R.; KANE, C. J.; HOULE, J. D. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. **Exp Neurol**, 148, n. 2, p. 433-443, Dec 1997.

PRINS, M.; DUTTA, R.; BASELMANS, B.; BREVE, J. J.; BOL, J. G.; DECKARD, S. A.; VAN DER VALK, P.; AMOR, S.; TRAPP, B. D. *et al.* Discrepancy in CCL2 and CCR2 expression in white versus grey matter hippocampal lesions of Multiple Sclerosis patients. **Acta Neuropathol Commun**, 2, p. 98, Aug 23 2014.

RAJBHANDARI, L.; TEGENGE, M. A.; SHRESTHA, S.; GANESH KUMAR, N.; MALIK, A.; MITHAL, A.; HOSMANE, S.; VENKATESAN, A. Toll-like receptor 4 deficiency impairs microglial phagocytosis of degenerating axons. **Glia**, 62, n. 12, p. 1982-1991, Dec 2014.

RIBEIRO, F. M.; VIEIRA, L. B.; PIRES, R. G.; OLMO, R. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacol Res**, 115, p. 179-191, Jan 2017.

RIVERA, A.; VANZULLI, I.; BUTT, A. M. A Central Role for ATP Signalling in Glial Interactions in the CNS. **Curr Drug Targets**, 17, n. 16, p. 1829-1833, 2016.

ROSSI, D.; BRAMBILLA, L.; VALORI, C. F.; RONCORONI, C.; CRUGNOLA, A.; YOKOTA, T.; BREDESEN, D. E.; VOLTERRA, A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. **Cell Death Differ**, 15, n. 11, p. 1691-1700, Nov 2008.

ROTHHAMMER, V.; MASCANFRONI, I. D.; BUNSE, L.; TAKENAKA, M. C.; KENISON, J. E.; MAYO, L.; CHAO, C. C.; PATEL, B.; YAN, R. *et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. **Nat Med**, 22, n. 6, p. 586-597, Jun 2016.

ROUACH, N.; KOULAKOFF, A.; ABUDARA, V.; WILLECKE, K.; GIAUME, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. **Science**, 322, n. 5907, p. 1551-1555, Dec 5 2008.

RUSSO, M. V.; MCGAVERN, D. B. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. **Science**, 353, n. 6301, p. 783-785, Aug 19 2016.

SAITTA, K. S.; LERCHER, L. D.; SAINATO, D. M.; PATEL, A.; HUANG, Y.; MCAULIFFE, G.; DREYFUS, C. F. CHPG enhances BDNF and myelination in cuprizone-treated mice through astrocytic metabotropic glutamate receptor 5. **Glia**, 69, n. 8, p. 1950-1965, Aug 2021.

SANCHEZ-MICO, M. V.; JIMENEZ, S.; GOMEZ-ARBOLEDAS, A.; MUNOZ-CASTRO, C.; ROMERO-MOLINA, C.; NAVARRO, V.; SANCHEZ-MEJIAS, E.; NUNEZ-DIAZ, C.; SANCHEZ-VARO, R. *et al.* Amyloid-beta impairs the phagocytosis of dystrophic synapses by astrocytes in Alzheimer's disease. **Glia**, 69, n. 4, p. 997-1011, Apr 2021.

SAUNDERS, A.; MACOSKO, E. Z.; WYSOKER, A.; GOLDMAN, M.; KRIENEN, F. M.; DE RIVERA, H.; BIEN, E.; BAUM, M.; BORTOLIN, L. *et al.* Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. **Cell**, 174, n. 4, p. 1015-1030 e1016, Aug 9 2018.

SERVITJA, J. M.; MASGRAU, R.; SARRI, E.; PICATOSTE, F. Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes. **J Neurochem**, 72, n. 4, p. 1441-1447, Apr 1999.

SHAH, A.; SILVERSTEIN, P. S.; SINGH, D. P.; KUMAR, A. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5, AKT/PI3K signaling and NF-kappaB pathway in methamphetamine-mediated increase in IL-6 and IL-8 expression in astrocytes. **J Neuroinflammation**, 9, p. 52, Mar 15 2012.

SHINOZAKI, Y.; SHIBATA, K.; YOSHIDA, K.; SHIGETOMI, E.; GACHET, C.; IKENAKA, K.; TANAKA, K. F.; KOIZUMI, S. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y(1) Receptor Downregulation. **Cell Rep**, 19, n. 6, p. 1151-1164, May 9 2017.

SHRIVASTAVA, A. N.; KOWALEWSKI, J. M.; RENNER, M.; BOUSSET, L.; KOULAKOFF, A.; MELKI, R.; GIAUME, C.; TRILLER, A. beta-amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors. **Glia**, 61, n. 10, p. 1673-1686, Oct 2013.

SINGH, S. K.; STOGSDILL, J. A.; PULIMOOD, N. S.; DINGS DALE, H.; KIM, Y. H.; PILAZ, L. J.; KIM, I. H.; MANHAES, A. C.; RODRIGUES, W. S., Jr. *et al.* Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1alpha and NL1 via Hevin. **Cell**, 164, n. 1-2, p. 183-196, Jan 14 2016.

SINHA, A.; KUSHWAHA, R.; MOLESWORTH, K.; MYCHKO, O.; MAKARAVA, N.; BASKAKOV, I. V. Phagocytic Activities of Reactive Microglia and Astrocytes Associated with Prion Diseases Are Dysregulated in Opposite Directions. **Cells**, 10, n. 7, Jul 8 2021.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nat Rev Neurosci**, 16, n. 5, p. 249-263, May 2015.

SOUBANNIER, V.; MAUSSION, G.; CHAINEAU, M.; SIGUTOVA, V.; ROULEAU, G.; DURCAN, T. M.; STIFANI, S. Characterization of human iPSC-derived astrocytes with potential for disease modeling and drug discovery. **Neurosci Lett**, 731, p. 135028, Jul 13 2020.

SPAMPINATO, S. F.; COPANI, A.; NICOLETTI, F.; SORTINO, M. A.; CARACI, F. Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells: A New Potential Target for Neuroprotection? **Front Mol Neurosci**, 11, p. 414, 2018.

SPURRIER, J.; NICHOLSON, L.; FANG, X. T.; STONER, A. J.; TOYONAGA, T.; HOLDEN, D.; SIEGERT, T. R.; LAIRD, W.; ALLNUTT, M. A. *et al.* Reversal of synapse loss in Alzheimer mouse models by targeting mGluR5 to prevent synaptic tagging by C1Q. **Sci Transl Med**, 14, n. 647, p. eabi8593, Jun 2022.

SUH, Y. H.; CHANG, K.; ROCHE, K. W. Metabotropic glutamate receptor trafficking. **Mol Cell Neurosci**, 91, p. 10-24, Sep 2018.

SUN, W.; MCCONNELL, E.; PARE, J. F.; XU, Q.; CHEN, M.; PENG, W.; LOVATT, D.; HAN, X.; SMITH, Y. *et al.* Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. **Science**, 339, n. 6116, p. 197-200, Jan 11 2013.

SUZUKI, A.; STERN, S. A.; BOZDAGI, O.; HUNTLEY, G. W.; WALKER, R. H.; MAGISTRETTI, P. J.; ALBERINI, C. M. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. **Cell**, 144, n. 5, p. 810-823, Mar 4 2011.

TANSEY, M. G.; WALLINGS, R. L.; HOUSER, M. C.; HERRICK, M. K.; KEATING, C. E.; JOERS, V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. **Nat Rev Immunol**, 22, n. 11, p. 657-673, Nov 2022.

THAKUR, S.; DHAPOLA, R.; SARMA, P.; MEDHI, B.; REDDY, D. H. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. **Inflammation**, 46, n. 1, p. 1-17, Feb 2023.

THOMAS, A. L.; LEHN, M. A.; JANSSEN, E. M.; HILDEMAN, D. A.; CHOUGNET, C. A. Naturally-aged microglia exhibit phagocytic dysfunction accompanied by gene expression changes reflective of underlying neurologic disease. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 19471, Nov 14 2022.

TORRES-ESPIN, A.; FORERO, J.; FENRICH, K. K.; LUCAS-OSMA, A. M.; KRAJACIC, A.; SCHMIDT, E.; VAVREK, R.; RAPOSO, P.; BENNETT, D. J. *et al.* Eliciting inflammation enables successful rehabilitative training in chronic spinal cord injury. **Brain**, 141, n. 7, p. 1946-1962, Jul 1 2018.

TRACHTENBERG, J. T.; CHEN, B. E.; KNOTT, G. W.; FENG, G.; SANES, J. R.; WELKER, E.; SVOBODA, K. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. **Nature**, 420, n. 6917, p. 788-794, Dec 19-26 2002.

TRINDADE, P.; LOIOLA, E. C.; GASPAROTTO, J.; RIBEIRO, C. T.; CARDOZO, P. L.; DEVALLE, S.; SALERNO, J. A.; ORNELAS, I. M.; LEDUR, P. F. *et al.* Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes. **Glia**, 68, n. 7, p. 1396-1409, Jul 2020.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, 35, n. Web Server issue, p. 71-74, 2007.

VERKHRATSKY, A.; LI, B.; SCUDERI, C.; PARPURA, V. Principles of Astroglipathology. **Adv Neurobiol**, 26, p. 55-73, 2021.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of Astroglia. **Physiol Rev**, 98, n. 1, p. 239-389, Jan 1 2018.

VERONI, C.; GABRIELE, L.; CANINI, I.; CASTIELLO, L.; COCCIA, E.; REMOLI, M. E.; COLUMBA-CABEZAS, S.; ARICO, E.; ALOISI, F. *et al.* Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. **Mol Cell Neurosci**, 45, n. 3, p. 234-244, Nov 2010.

VILLASANA, L. E.; KLANN, E.; TEJADA-SIMON, M. V. Rapid isolation of synaptoneurosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. **J Neurosci Methods**, 158, n. 1, p. 30-36, Nov 15 2006.

WANG, H.; ZHUO, M. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. **Front Pharmacol**, 3, p. 189, 2012.

WANG, W. Y.; TAN, M. S.; YU, J. T.; TAN, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Ann Transl Med**, 3, n. 10, p. 136, Jun 2015.

WHEELER, M. A.; CLARK, I. C.; TJON, E. C.; LI, Z.; ZANDEE, S. E. J.; COUTURIER, C. P.; WATSON, B. R.; SCALISI, G.; ALKWAI, S. *et al.* MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. **Nature**, 578, n. 7796, p. 593-599, Feb 2020.

WHEELER, M. A.; JARONEN, M.; COVACU, R.; ZANDEE, S. E. J.; SCALISI, G.; ROTHHAMMER, V.; TJON, E. C.; CHAO, C. C.; KENISON, J. E. *et al.* Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation. **Cell**, 176, n. 3, p. 581-596 e518, Jan 24 2019.

WISNIEWSKI, K.; CAR, H. (S)-3,5-DHPG: a review. **CNS Drug Rev**, 8, n. 1, p. 101-116, Spring 2002.

WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, 102, n. 4, p. 639-644, Feb 16 2010.

XING, H. Q.; ZHANG, Y.; IZUMO, K.; ARISHIMA, S.; KUBOTA, R.; YE, X.; XU, Q.; MORI, K.; IZUMO, S. Decrease of aquaporin-4 and excitatory amino acid transporter-2 indicate astrocyte dysfunction for pathogenesis of cortical degeneration in HIV-associated neurocognitive disorders. **Neuropathology**, 37, n. 1, p. 25-34, Feb 2017.

YANG, Q. Q.; ZHOU, J. W. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. **Glia**, 67, n. 6, p. 1017-1035, Jun 2019.

YIN, Y.; CUI, Q.; GILBERT, H. Y.; YANG, Y.; YANG, Z.; BERLINICKE, C.; LI, Z.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, C.; HE, H. *et al.* Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 46, p. 19587-19592, Nov 17 2009.

YIN, Y.; HENZL, M. T.; LORBER, B.; NAKAZAWA, T.; THOMAS, T. T.; JIANG, F.; LANGER, R.; BENOWITZ, L. I. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. **Nat Neurosci**, 9, n. 6, p. 843-852, Jun 2006.

YUAN, J.; GE, H.; LIU, W.; ZHU, H.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; YANG, Y.; YIN, Y.; CHEN, W. *et al.* M2 microglia promotes neurogenesis and oligodendrogenesis from neural stem/progenitor cells via the PPARgamma signaling pathway. **Oncotarget**, 8, n. 12, p. 19855-19865, Mar 21 2017.

ZAMANIAN, J. L.; XU, L.; FOO, L. C.; NOURI, N.; ZHOU, L.; GIFFARD, R. G.; BARRES, B. A. Genomic analysis of reactive astrogliosis. **J Neurosci**, 32, n. 18, p. 6391-6410, May 2 2012.

ZEISEL, A.; HOCHGERNER, H.; LONNERBERG, P.; JOHNSON, A.; MEMIC, F.; VAN DER ZWAN, J.; HARING, M.; BRAUN, E.; BORM, L. E. *et al.* Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. **Cell**, 174, n. 4, p. 999-1014 e1022, Aug 9 2018.

ZHANG, Y.; SLOAN, S. A.; CLARKE, L. E.; CANEDA, C.; PLAZA, C. A.; BLUMENTHAL, P. D.; VOGEL, H.; STEINBERG, G. K.; EDWARDS, M. S. *et al.* Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. **Neuron**, 89, n. 1, p. 37-53, Jan 6 2016.

ZIV, Y.; RON, N.; BUTOVSKY, O.; LANDA, G.; SUDAI, E.; GREENBERG, N.; COHEN, H.; KIPNIS, J.; SCHWARTZ, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nat Neurosci**, 9, n. 2, p. 268-275, Feb 2006.

8. PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS DURANTE O DOUTORADO

8.1 Artigos publicados:

DE LIMA, I. B. Q.; RIBEIRO, F. M. The Implication of Glial Metabotropic Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease. *Current Neuroparmacology*, v. 21, n. 2, p. 164-182, 2021. DOI: 10.2174/1570159X20666211223140303.

DE SOUZA, J. M.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; MACIEL, E. M. A.; SILVA, N. C.; LIMA, I. B. Q.; DORIA, J. G.; OLMO, I. G.; RIBEIRO, F. M. mGluR5 ablation leads to age-related synaptic plasticity impairments and does not improve Huntington's disease phenotype. *Scientific Reports*, v. 12, p. 8982, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-13029-Z.

DE LIMA, I. B. Q.; CARDOZO, P. L.; FAHEL, J. S.; LACERDA, J. P. S.; MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L.; RIBEIRO, F. M. Blockade of mGluR5 in astrocytes derived from human iPSCs modulates astrocytic function and increases phagocytosis. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1283331, 11 dez. 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1283331. (Em anexo).

8.2 Resumos publicados em anais de congresso:

LIMA, I. B. Q., CARDOZO, P. L., FAHEL, J. S., LACERDA, J. P. S., RIBEIRO, F. M. BLOCKADE OF MGLUR5 IN ASTROCYTES DERIVED FROM HUMAN IPSCS MODULATES ASTROCYTIC FUNCTION AND INCREASES PHAGOCYTOSIS. In: XXXVII Reunião Anual da FeSBE, 2023, Búzios/RJ. FeSBE 2023.

9. ANEXOS



OPEN ACCESS

EDITED BY
Sergio C. Oliveira,
University of São Paulo, BrazilREVIEWED BY
Guillermo Hernán Giambartolomei,
National Scientific and Technical Research
Council (CONICET), Argentina
Hem Chandra Jha,
Indian Institute of Technology Indore, India*CORRESPONDENCE
Fabiola M. Ribeiro
✉ fmrbeiro@icb.ufmg.br[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorshipRECEIVED 25 August 2023
ACCEPTED 23 November 2023
PUBLISHED 11 December 2023CITATION
de Lima IBQ, Cardozo PL, Fahel JS,
Lacerda JPS, Miranda AS, Teixeira AL and
Ribeiro FM (2023) Blockade of mGluR5 in
astrocytes derived from human iPSCs
modulates astrocytic function and
increases phagocytosis.
Front. Immunol. 14:1283331.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1283331COPYRIGHT
© 2023 de Lima, Cardozo, Fahel, Lacerda,
Miranda, Teixeira and Ribeiro. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.Blockade of mGluR5 in
astrocytes derived from
human iPSCs modulates
astrocytic function and
increases phagocytosisIzabella B. Q. de Lima^{1†}, Pablo L. Cardozo^{1†}, Julia S. Fahel¹,
Juliana P. S. Lacerda¹, Aline S. Miranda², Antônio L. Teixeira³
and Fabiola M. Ribeiro ^{1*}¹Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Department of Morphology, Institute of Biological
Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Neuropsychiatry
Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Texas Health Science
Center at Houston, Houston, TX, United States

TNF- α is essential for induction and maintenance of inflammatory responses and its dysregulation is associated with susceptibility to various pathogens that infect the central nervous system. Activation of both microglia and astrocytes leads to TNF- α production, which in turn triggers further activation of these cells. Astrocytes have been implicated in the pathophysiology of a wide range of neurodegenerative diseases with either harmful or protective roles, as these cells are capable of secreting several inflammatory factors and also promote synapse elimination and remodeling. These responses are possible because they sense their surroundings via several receptors, including the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). Under neuroinflammatory conditions, mGluR5 activation in astrocytes can be neuroprotective or have the opposite effect. In the current study, we investigated the role of mGluR5 in hiPSC-derived astrocytes subjected to pro-inflammatory stimulation by recombinant TNF- α (rTNF- α). Our results show that mGluR5 blockade by CTEP decreases the secreted levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) following short rTNF- α stimulation, although this effect subsides with time. Additionally, CTEP enhances synaptoneurosome phagocytosis by astrocytes in both non-stimulated and rTNF- α -stimulated conditions, indicating that mGluR5 blockade alone is enough to drive synaptic material engulfment. Finally, mGluR5 antagonism as well as rTNF- α stimulation augment the expression of the reactivity marker SERPINA3 and reduces the expression of synaptogenic molecules. Altogether, these data suggest a complex role for mGluR5 in human astrocytes, since its blockade may have beneficial and detrimental effects under inflammatory conditions.

KEYWORDS

mGluR5, astrocyte, hiPSC, phagocytosis, TNF α

1 Introduction

Astrocytes are the most abundant glial cells of the mammalian central nervous system (CNS), playing important roles in CNS physiology and being implicated in the pathology of a diverse array of neurological diseases (1, 2). Astroglia is formed by a highly heterogeneous population of astrocytes (3). These cells may assume a reactive phenotype in pathological contexts, releasing inflammatory factors that might impact disease outcomes either in a detrimental or beneficial manner (4, 5). One important role played by glial cells is the phagocytosis of dead cells, synapses and myelin (6, 7). Although aberrant synapse pruning was shown to contribute to dementia (8), elimination of dystrophic synapses and dendrites, as well as phagocytosis of extracellular protein aggregates, such as amyloid- β (A β) (9, 10), is essential for proper brain function. Another important function of astrocytes is to promote synapse remodelling by secreting synaptogenic molecules, including brain derived neurotrophic factor (BDNF) (11), glypican-4 (GPC4) (12), hevin (13), and thrombospondins (TSPs) (13, 14).

The metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) is a G-protein-coupled receptor (GPCR) whose involvement in neurodegenerative disorders has been widely studied (15). As in neurons, mGluR5 stimulation in astrocytes activates the $G\alpha_{q/11}$ /PLC β /IP $_3$ pathway, increasing intracellular Ca $^{2+}$, which facilitates glutamate release (16–19). Moreover, stimulation of this receptor activates non-canonical cell signalling pathways, including mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phospholipase D (PLD) (20, 21). Although mGluR5 expression in astrocytes declines postnatally (22, 23), previous works have shown an upregulation of this receptor in astrocytes in neurological diseases that most commonly affect adults or the elderly, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (24), multiple sclerosis (MS) (25), and Alzheimer's disease (AD) (26), suggesting a relevant role of mGluR5 in gliopathology. In microglia, the activation of mGluR5 has an anti-inflammatory effect, decreasing microglial expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and production of reactive oxygen species (27, 28). However, the role of mGluR5 in astrocytes remains controversial, as some studies indicate that activation of astrocytic mGluR5 following injury is protective for neighbouring cells as it triggers the release of growth factors and synaptogenic molecules (29, 30), whereas others have shown that mGluR5 activation is harmful as it increases the production of inflammatory mediators (31, 32). For instance, the inhibition of mGluR5 by MPEP prevents methamphetamine-induced increase in IL-6 and IL-8 in a human astroglia cell line (32). Conversely, inhibition of mGluR5 in murine astrocytes can reduce the expression of IL-1 β and MCP-1 (33). Furthermore, it has been shown that the activation of mGluR5 by DHPG has no effect on the IL-1 β -induced expression of IL-6 in human astrocytes (34). Despite all these studies investigating the role of astrocytic mGluR5 in neurological disorders, it has been challenging to successfully replicate these findings in clinical trials. This discrepant results can be partially explained by the molecular differences between human and murine glial cells (35, 36). For instance, it has been pointed that these cells display species-specific gene expression

profiles upon poly-I:C or TNF- α stimulation, with human astrocytes showing stronger immune response compared to their murine counterparts (35). Thus, more studies are needed to investigate how mGluR5 can impact the activation of human astrocytes and the production of inflammatory and synaptogenic mediators.

Astrocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are widely used to study cell physiology, as well as an *in vitro* model of neurological diseases (37–40). In this study we used cultured hiPSC-derived astrocytes to investigate the influence of mGluR5 on the astrocytic response to inflammatory stimulation with recombinant TNF- α (rTNF- α). TNF- α is essential for induction and maintenance of inflammatory responses and its dysregulation is associated with susceptibility to various CNS pathogens (41, 42). Moreover, reactive astrocytes lead to TNF- α production, which in turn triggers further activation of these cells. To modulate mGluR5 activity, we employed the mGluR5 negative allosteric modulator (NAM) CTEP, which is a potent and highly specific drug that acts as an inverse agonist of mGluR5, effectively blocking its constitutive activity (43). We show that, in the presence of rTNF- α , mGluR5 inhibition decreases the secreted levels of IL-6 and IL-8 and increases the expression of the reactive astrocyte marker *SERPINA3*. Since reactive astrogliosis can display different functional profiles (44) and given its role in synaptic turnover, a process altered in many neurological diseases (45), we also assessed the rate of phagocytosis of synaptoneurosomes by astrocytes and the expression of synaptogenic proteins. We show that CTEP enhanced phagocytosis regardless of rTNF- α , while both CTEP and rTNF- α downregulated the expression of synaptogenic molecules. Thereby, the current results reveal the multifaceted role of mGluR5 in astrocyte reactivity and function, highlighting its potential for both detrimental and beneficial effects depending on the specific context.

2 Materials and methods

2.1 Human-induced pluripotent stem cell line and cell culture maintenance

The 7889SA cell line was obtained from the New York Stem Cell Foundation (NYSCF ID CO0002-01-SV-003) and described previously (46). hiPSCs were maintained on 6-well plates coated with Geltrex (Gibco, cat no. A1413302) in StemFlex Medium (Gibco, cat no. A3349301). Upon reaching 80–90% confluence, cells were incubated for 3–4 min in 500 μ M EDTA (Sigma, cat no. EDS) in PBS, dissociated in clumps and seeded into new 6-well Geltrex-coated plates for expansion. Media was changed every 48h.

2.2 Human astrocytes differentiation

Astrocytes were differentiated from hiPSCs as previously described (38). hiPSCs were dissociated into single cells using StemPro Accutase (Gibco, cat no. A1110501) and seeded into 6-

well Geltrex-coated plates at 3×10^4 cells/cm² in StemFlex Medium supplemented with 10 μ M Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Thiazovivin (Sigma Aldrich, cat no. SML1045). In order to start differentiation (day 0), medium was changed to PSC Neural Induction Medium containing Neurobasal Medium (Gibco, cat no. 21103-049), Neural Induction Supplement (Gibco, cat no. A1647701) and 1% penicillin-streptomycin solution (Gibco, cat no. 15410-122). Media was changed every 48 h. On day 7, NSCs were dissociated with Accutase and plated at 1×10^5 cells/cm² in 60 mm Geltrex-coated dishes in NSC Expansion Medium containing 50% Advanced DMEM/F12 (Gibco, cat no. 12634010), 50% Neurobasal Medium, Neural Induction Supplement and 1% penicillin-streptomycin solution supplemented with 10 μ M ROCK inhibitor Thiazovivin. Media changes were performed every 48 h. When NSCs reached 90% confluence, cells were dissociated with Accutase and seeded at 5×10^4 cells/cm² in 25 cm² Geltrex-coated culture flasks in Astrocyte Induction Medium containing DMEM/F12 Medium (Gibco, cat no. 12400024), N2 supplement (Gibco, cat no. 17502048), 1% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, cat no. 12657-029) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco, cat no. 15240112). Media was changed every 48 h for 21 days. During this period, upon reaching full confluence, cells were expanded at a ratio of 1:3 using Accutase to 75 cm² Geltrex-coated culture flasks. By the end of differentiation, media was switched to Astrocyte Maturation Medium (DMEM/F12, 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution) for an additional period of at least 5 weeks. During this period, media was changed twice a week and when reaching full confluence, cells were dissociated using Trypsin/EDTA 0.125% (Gibco, cat no. 25200072) and expanded to 175 cm² culture flasks at a ratio of 1:2 (without Geltrex coating). Cells were maintained under standard culture conditions (95% relative humidity and 5% CO₂ at 37°C) and tested routinely for *Mycoplasma* contamination, as previously described (47).

2.3 Drug treatment

After nine weeks of maturation, upon reaching 100% confluence in 175 cm² culture flasks, hiPSC-derived astrocytes were dissociated with Trypsin/EDTA 0.125% (Gibco, cat no. 25200072) and seeded at 1×10^4 cells/cm² in 6-well plates. After 5 days in culture, cells were washed three times with PBS, DMEM/F12 media was replenished, and astrocytes were serum starved for 24 h. Then, cells were treated with either 10 μ M CTEP (Axon Medchem, cat no. Axon 1972) or vehicle (DMSO; Sigma-Aldrich, cat no. 41639) and subsequently stimulated with 10 ng/mL rTNF- α (BioLegend, cat no. 717904) for either 4h or 24 h. In the case of lipopolysaccharide (LPS) treatment, astrocytes were treated with either 0.1 or 1 μ g/mL LPS (Sigma, cat no. L6529) for 24 h. Drugs were kept in the media throughout the whole experiment. After treatment, the supernatant was flash frozen and stored at -80°C until further use, and cells were collected with 1 mL of TRIzolTM reagent (Invitrogen, cat no. 15596018), transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes and frozen at -80°C.

2.4 Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzolTM reagent as per manufacturer's instructions and resuspended in 12 μ L of nuclease-free water. RNA concentration and quality was analyzed by spectrophotometer (Multiskan[®] GO, Thermo Scientific). cDNAs were prepared from 800 ng of total RNA extracted in a 20 μ L final reverse transcription reaction. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) was performed with 10x diluted cDNA using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix in the QuantStudioTM 7 Flex real-time PCR system platform (Applied Biosystems[®]). RT-qPCR assays were performed to quantify the mRNA levels of the following genes: *C3* (NM_000064.3); *IPO8* (NM_006390.3); *RPLP0* (NM_001002.3); *MERTK* (NM_006343.2); *ITGAV* (NM_001144999.3); *SERPINA3* (NM_001085.5); *VCAM1* (NM_001078.5); *S100A10* (NM_002966.3); *BDNF* (NM_170735.6); *GPC4* (NM_001448.3); *TSP1* (NM_003246.4); *FKBP5* (NM_001145775.3); *SERPING1* (NM_000062.3); *GBP2* (NM_004120.5); *NFATC3* (NM_173163.3); *NFATC4* (NM_001198967.3); and *GRM5* (NM_001384268.1). Primers were designed using the Primer3Plus Program (48). Primer sequences are listed in Table 1.

Previous verification of undesired secondary formations or dimers between primers were performed using "OligoAnalyser 3.1" tool (Integrated DNA Technologies[®]), available at <https://www.idtdna.com/calc/analyser>. All primers used in this work were validated by serial dilution assay and the reaction efficiency was calculated, comprising 90-110% (data not shown). Changes in gene expression were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, using the average of the housekeeping genes *IPO8* and *RPLP0* for normalization.

2.5 Immunofluorescence staining

After 5 weeks of maturation, hiPSC-derived astrocytes were plated onto acid-etched clean glass coverslips coated with 50 μ g/mL poly-D-lysine (Sigma, cat no. P6407) in 24-well plates at 1×10^3 cells/cm² in Astrocytes Maturation Media. After 5 days in culture, cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma, cat no. 158127) diluted in PBS. Samples were permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Labsynth, cat no. T2502) diluted in PBS (PBST) for 10 min and blocked with 2% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, cat no. A7906) diluted in PBST (blocking solution) for 1 h at room temperature. Then, cells were washed three times with PBS and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in blocking solution: anti-mGluR5 (1:100, Millipore, cat no. AB5675), anti-S100 β (1:200, Abcam, cat no. ab52642) and anti-GFAP (1:200, Cell Signaling, cat no. 12389). After incubation, cells were washed three times with PBS and incubated for 1 h at room temperature with the following secondary antibody and staining reagents diluted in blocking solution: anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:400, Invitrogen, cat no. A-11008), Hoechst (1:500, Invitrogen, cat no. H3570) and Alexa Fluor 633 Phalloidin (1:1000, Invitrogen, cat no. A22284). Coverslips were washed

TABLE 1 qPCR primer sequences.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
C3	CTGCCAGTTTCGAGGTCAT	CGAGCCATCCTCAATCGGAA
IPO8	TCCGAACTATTATCGACAGGACC	GTTCAAAGAGCCGAGCTACAA
RPLP0	TTAAACCCTGCGTGGCAATC	ATCTGCTTGGAGCCCACATT
MERTK	TGGCGTAGAGCTATCACTG	CTGGCGTGAGGAAGGGATAA
ITGAV	AATCTTCCAATTGAGGATATCAC	AAAACAGCCAGTAGCAACAAT
SERPINA3	CCTGAGGCAGAGTTGAGAATGG	TCAAGTGGGCTGTTAGGGTG
VCAM1	CGAACCCAAACAAAGGCAGA	ACAGGATTTTCGGAGCAGGA
S100A10	AACAAAGGAGGACCTGAGAGTAC	CTTGCCATCTCTACACTGGTCC
BDNF	AGTTGGGAGCCTGAAATAGTGG	AGGATGCTGGTCCAAGTGGT
GPC4	GTCAGCGAACAGTGCAATCAT	ACATTTCCCACCAGTAGTAAC
TSP1	GCCAACAAACAGGTGTGCAA	GCAGATGATGCCATTGCCAG
IL-6	AGAGGCACTGGCAGAAAC	TGCAGGAACTGGATCAGGAC
IL-8	GAGAGTGATTGAGAGTGAC	GAATTCTCAGCCCTCTTCAA
GBP2	AATTAGGGGCCAGTTGGAAG	AAGAGACGGTAACCTCCTGGT
NFATC3	GCGGCCTGCAGATCTTGAGC	TGATGTGGTAAGCAAAGTGGTGTGGT
NFATC4	CCCCGAGTACAGCAACAAGA	CCTCTTGAGATCACAGGC
GRM5	ATGCCGGGTGACATCATTATT	TGAATGCCATACTGTTACCGG

three times as mentioned above and mounted on clean glass slides with DAKO Mounting Medium (Agilent Technologies, cat no. S302380-2). Astrocytes were imaged using a Nikon A1 Laser Confocal Microscope (CGB, UFMG, Brazil).

2.6 Synaptoneurosomes isolation and staining

Housing and all methods and experimentations were carried out in compliance with the ARRIVE guidelines (49) and according to the guidelines of the Brazilian National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Federal University of Minas Gerais, under the protocol number CEUA #120/2017. A 12-month-old male wild-type C57BL/6 mouse was obtained from UFMG Central Animal Facility. Mouse brain was dissected, weighed, and cut into sections of approximately 100 mg that were individually transferred to an ice-cold sterile Dounce homogenizer with 1 mL of synaptoneurosomes isolation buffer (SIB) (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT and protease inhibitors, pH 7.0; sterile-filtered) (50). Tissue was broken with 10 slow strokes, homogenates were transferred to 1.5 mL microcentrifuge conical tubes and centrifuged at 1200 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to new 1.5 mL microcentrifuge tubes and centrifuged at 15000 g for 20 min at 4°C. The pelleted debris fraction and a small aliquot of the supernatant (synaptoneurosomal homogenate) were collected in SIB and stored at -80°C for later validation. The supernatant (cytosolic fraction) was collected into

new 1.5 mL microcentrifuge tubes and frozen at -80°C and the pelleted synaptoneurosomes resuspended in SIB + 5% DMSO (Sigma, cat no. D8418), aliquoted and frozen at -80°C until later use.

On the day of synaptoneurosomal engulfment assay, synaptoneurosomes aliquots were thawed and their protein concentration determined via the Bradford Protein Assay (Bio-rad, cat no. 5000205). Synaptoneurosomes were spun down by centrifugation at 15000 g for 20 min at 4°C, supernatant was discarded, and the pellet resuspended in 2 μ M Vybrant CM-Dil solution (Invitrogen, cat no. V22888) diluted in room temperature sterile PBS. Staining was performed according to manufacturer instructions. CM-Dil-labeled synaptoneurosomes were spun down as described above, washed twice with ice-cold PBS to remove fluorescent dye excess and resuspended in ice-cold PBS adjusting its concentration to 0.25 μ g/ μ L. Synaptoneurosomes were kept on ice and protected from light until its use in the aforementioned assay. All procedures were carried out under sterile conditions.

2.7 Synaptoneurosomes engulfment assay and analysis

hiPSC-derived astrocytes were plated onto acid-etched clean glass coverslips coated with 50 μ g/mL poly-D-lysine in 24-well plates at 5.5×10^3 cells/cm² in Astrocytes Maturation Media. After 5 days in culture, cells were washed three times with PBS and stained with 10 μ M CellTracker Blue CMF₂HC Dye (Invitrogen, cat no. C12881) diluted in warm DMEM/F12 without FBS and incubated for 45 min in the cell culture incubator. The staining solution was

removed, fresh DMEM/F12 media was replenished, and astrocytes serum starved for 22 h. On the following day, cells were pre-treated for 1 h with either 10 μ M CTEP or vehicle (DMSO) and subsequently stimulated with 10 ng/mL rTNF- α for an extra hour. Then, 1.875 μ g (7.5 μ L) of CM-Dil-labeled synaptoneurosomes were added into each well and incubated for 24 h. After incubation, cells were washed twice with room temperature PBS to remove non-engulfed material and fixed for 15 min with 4% PFA solution diluted in PBS. Coverslips were washed three times as mentioned above and mounted on clean glass slides with DAKO Mounting Medium. Images were acquired using a Nikon A1 Laser Confocal Microscope. All assays were carried out in duplicates and twice independently.

Images were analyzed using FIJI (v. 1.53t) and CellProfiler (v. 4.2.5) software programs. Briefly, CellTracker-labeled astrocytes and CM-Dil-labeled synaptoneurosomes corresponding channels were split and images pre-processed using File S1 and File S2 macros in FIJI, respectively, saved and exported in *.tif* format. Pre-processed *.tif* files were imported to CellProfiler and analyzed using the File S3 pipeline. Phagocytic Index (PI) was calculated for each cell using the formula below:

$$PI = \frac{\text{Engulfed synaptoneurosomes area } (\mu m^2)}{\text{Total cell area } (\mu m^2)}$$

Orthogonal projections and 3D rendering (Supplementary Figure S5 and Movie S1) of z-stacks were generated using FIJI and FluoRender (v. 2.29.2), respectively.

2.8 Immunoblotting

Protein concentration of synaptoneurosomal preparation fractions (pelleted debris, synaptoneurosomal homogenate, cytosolic fraction and isolated synaptoneurosomes) was measured using the Bradford Protein Assay. Twenty-five μ g of each fraction was diluted in Laemmli Sample Buffer, boiled at 95°C for 5 min and resolved in 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a 0.45 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad, cat no. 1620115), blocked with 5% BSA and 0.1% Tween-20 (Labsynth, cat no. T1028) diluted in TBS (TBST) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with the following primary antibodies in 3% BSA solution diluted in TBST: anti-syntaxin1 (1:200, Santa Cruz, cat no. sc-12736), anti-Homer (1:500, Santa Cruz, sc-8921) and anti-vinculin (1:10000, Abcam, ab129002). After incubation, primary antibodies were removed, membranes washed three times with TBST and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies in 3% free-fat milk diluted in TBST: HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:2500, Millipore, cat no. AP308P), HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:2500, Bio-Rad, cat no. 1706515) and HRP-conjugated anti-goat IgG (1:2500, Santa Cruz, sc-2354). Afterwards, membranes were washed three times as already described and incubated for 5 min with ECL Prime Western Blot Detection Reagent (Cytiva, cat no. RPN2232) for chemiluminescence detection using the ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) platform.

2.9 Cytokine quantification

Cytokines were quantified in cell culture supernatants by flow cytometry using the BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit (Becton, Dickinson and company - BD Biosciences, cat no. 551811), according to manufacturer's instructions. Briefly, equal amounts of each capture bead for human IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and IL12-p70 were mixed into a single tube. Fifty μ L of the capture beads mix were added to assay tubes followed by addition of 50 μ L of cell culture supernatants or cytokine standard dilutions. Then, 50 μ L of PE detection reagent were added and assay tubes were incubated protected from light for 3 hours at room temperature. After incubation, samples were washed with 1 mL of wash buffer and tubes were centrifuged at 200 g for 5 minutes. Supernatants were aspirated and discarded and the bead pellets were resuspended in 300 μ L of wash buffer. Sample acquisition was performed on the FACS Aria Fusion (BD Biosciences). The CBA Analysis Software (BD Biosciences) was used for data analysis based on standard concentration curves and the results were expressed as pg/mL.

2.10 Statistical analyses

Statistical analyses and data plots were performed using the GraphPad Prism (v. 8.0.1) software. Two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison tests with confidence level set to 0.95 ($\alpha = 0.05$) as the lowest accepted limit was carried out for all experiments, unless otherwise stated. For the synaptoneurosomes engulfment assay, the Kolmogorov-Smirnov test was executed, indicating the data followed a lognormal distribution. A generalized linear model fitted in the lognormal distribution, followed by Sidak's multiple comparison test with a confidence level set to 0.99 ($\alpha = 0.01$) as the lowest accepted limit was employed. This latter analysis was performed with the STATA (v. 14.0) software.

3 Results

3.1 mGluR5 blockade modulates rTNF- α -induced proinflammatory response in human astrocytes

Little is known about mGluR5 function in human cells. In order to investigate the role of mGluR5 in human astrocytes under proinflammatory conditions, astrocytes were differentiated from hiPSCs for four weeks and matured for an additional period of five weeks until they displayed strong expression of the canonical astrocytic markers GFAP (Figure 1A) and S100 β (Figure 1B). In addition, these hiPSC-derived astrocytes also showed mGluR5 mRNA (Supplementary Figure S1) and protein (Figure 1C) expression. Stimulation of hiPSC-derived astrocytes with LPS 1 μ g/mL led to only a marginal increase in IL-6 mRNA levels, whereas IL-8 expression remained unmodified (Supplementary Figure S2A

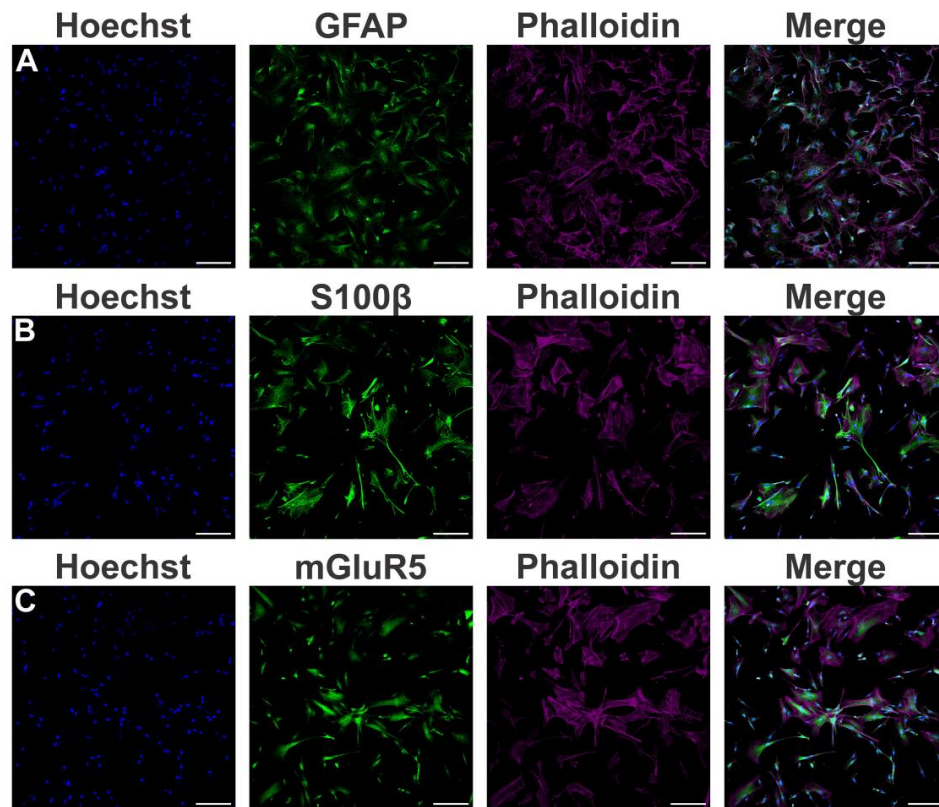


FIGURE 1

Characterization of astrocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). (A) Shown are representative laser scanning confocal micrographs from hiPSC-derived astrocytes immunolabeled for phalloidin (magenta), GFAP (green), and Hoechst (blue). (B) Shown are representative laser scanning confocal micrographs from hiPSC-derived astrocytes immunolabeled for phalloidin (magenta), S100 β (green), and Hoechst (blue). (C) Shown are representative laser scanning confocal micrographs from hiPSC-derived astrocytes immunolabeled for phalloidin (magenta), mGluR5 (green), and Hoechst (blue). Scale bar=200 μ m.

and S2B). However, following stimulation with rTNF- α 10 ng/mL, astrocytes increased the mRNA levels of both IL-6 and IL-8 (Supplementary Figure S2C and S2D). Thus, we decided to employ rTNF- α in this study to induce an inflammatory response. To further evaluate cell activation, we stimulated astrocytes with rTNF- α 10 ng/mL and measured the production of inflammatory factors in the cell culture supernatant. Upon stimulation with rTNF- α , astrocytes quickly responded by up-regulating IL-6 and IL-8 levels (Figure 2), while IL-1 β , IL-10 and IL-12p70 secretion was not detected. Both IL-6 and IL-8 secreted protein levels displayed a modest elevation at 4 h (Figures 2A, C), followed by a marked increase at 24 h post-stimulation (Figures 2B, D).

Blocking mGluR5 activity with CTEP (10 μ M) led to a reduction in IL-6 and IL-8 secretion only at 4 h post-stimulation (Figures 2A, C), with this effect wearing off at 24h (Figures 2B, D). Moreover, treatment with either rTNF- α or CTEP did not alter mGluR5 expression in hiPSC-derived astrocytes (Supplementary Figure S1). These data indicate that mGluR5 antagonism can

prevent pro-inflammatory cytokine production by astrocytes during a short rTNF- α exposure.

3.2 mGluR5 modulates the expression of the reactive astrocyte marker SERPINA3 in human astrocytes

It has been proposed that astrocytes can be polarized to either an inflammatory and neurotoxic (A1 astrocytes) or a neuroprotective (A2 astrocytes) phenotype in response to external stimulation (51–53). Accordingly, we analyzed the expression of the general reactive astrocyte markers *SERPINA3*, *NFATC3*, and *NFATC4*; the A1-reactive markers *C3*, vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM-1*), *GBP2*, *FKBP5*, and *SERPING1*; and the A2-reactive marker *S100A10* (40, 51–53) in human astrocytes. rTNF- α stimulation promoted an augmentation in *SERPINA3*, *C3*, *VCAM-1*, and *GPB2* transcript levels at all tested timepoints (Figure 3), while the transcriptional levels of *NFATC3*, *NFATC4*,

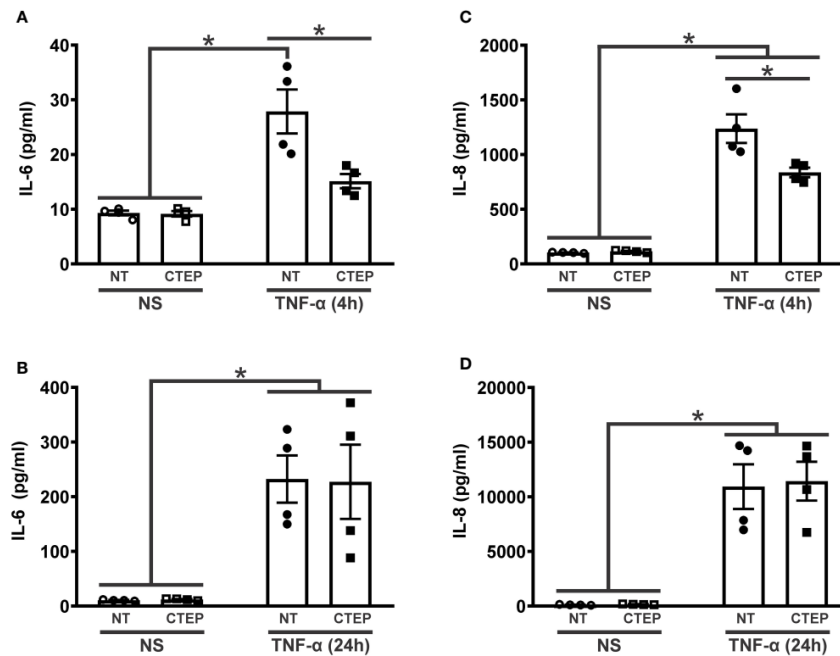


FIGURE 2

CTEP treatment reduces rTNF- α -induced expression of inflammatory factors. Graphs show protein quantification of IL-6 (A) and IL-8 (C) in the supernatant of hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 4 h. Graphs show protein quantification of IL-6 (B) and IL-8 (D) in the supernatant of hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 24 h. Protein levels were assessed by CBA, which was performed in duplicates. Data represents the means $\pm$ SEM, $n=4-6$. * ($p<0.05$) indicates significant differences.

FKBP5, *SERPING1*, and *S100A10* remained unchanged relative to non-stimulated astrocytes (Supplementary Figure S3). Notably, CTEP treatment led to an even greater up-regulation of *SERPINA3* gene expression in rTNF- α -stimulated astrocytes at all tested timepoints (Figures 3A, B). Additionally, CTEP treatment did

not modify the expression of *FKBP5*, *SERPING1*, *NFATC3*, *NFATC4*, and *S100A10* (Supplementary Figure S3) or induce further alterations in the expression of the reactive astrocyte markers *C3*, *VCAM-1* and *GBP2*, either in the presence or in the absence of rTNF- α stimulation (Figures 3C–H). Therefore,

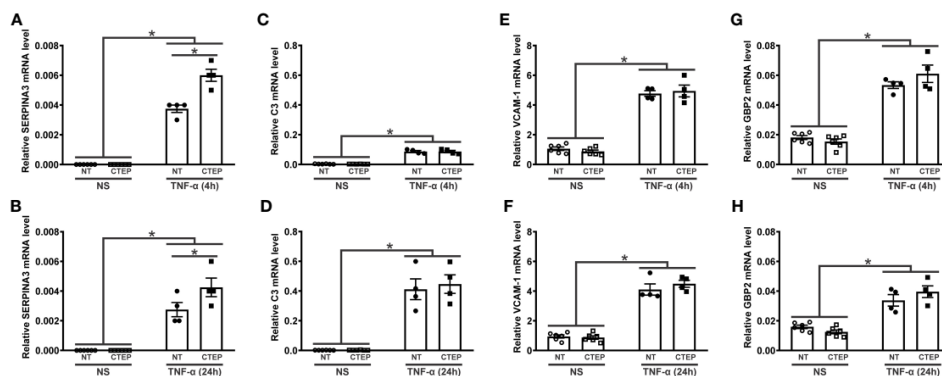


FIGURE 3

mGluR5 modulates the expression of the reactive astrocyte marker *SERPINA3* without modifying the expression of A1 and A2 markers. Graphs show mRNA levels of *SERPINA3* (A), *C3* (C), *VCAM-1* (E), and *GBP2* (G) in hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 4 h. Graphs show mRNA levels of *SERPINA3* (B), *C3* (D), *VCAM-1* (F), and *GBP2* (H) in hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 24 h. mRNA levels were assessed by quantitative RT-PCR, which was performed in triplicates and normalized to the average of *RPLP0* and *IPO8* mRNA levels. Data represents the means $\pm$ SEM, $n=4-6$. * ($p<0.05$) indicates significant differences.

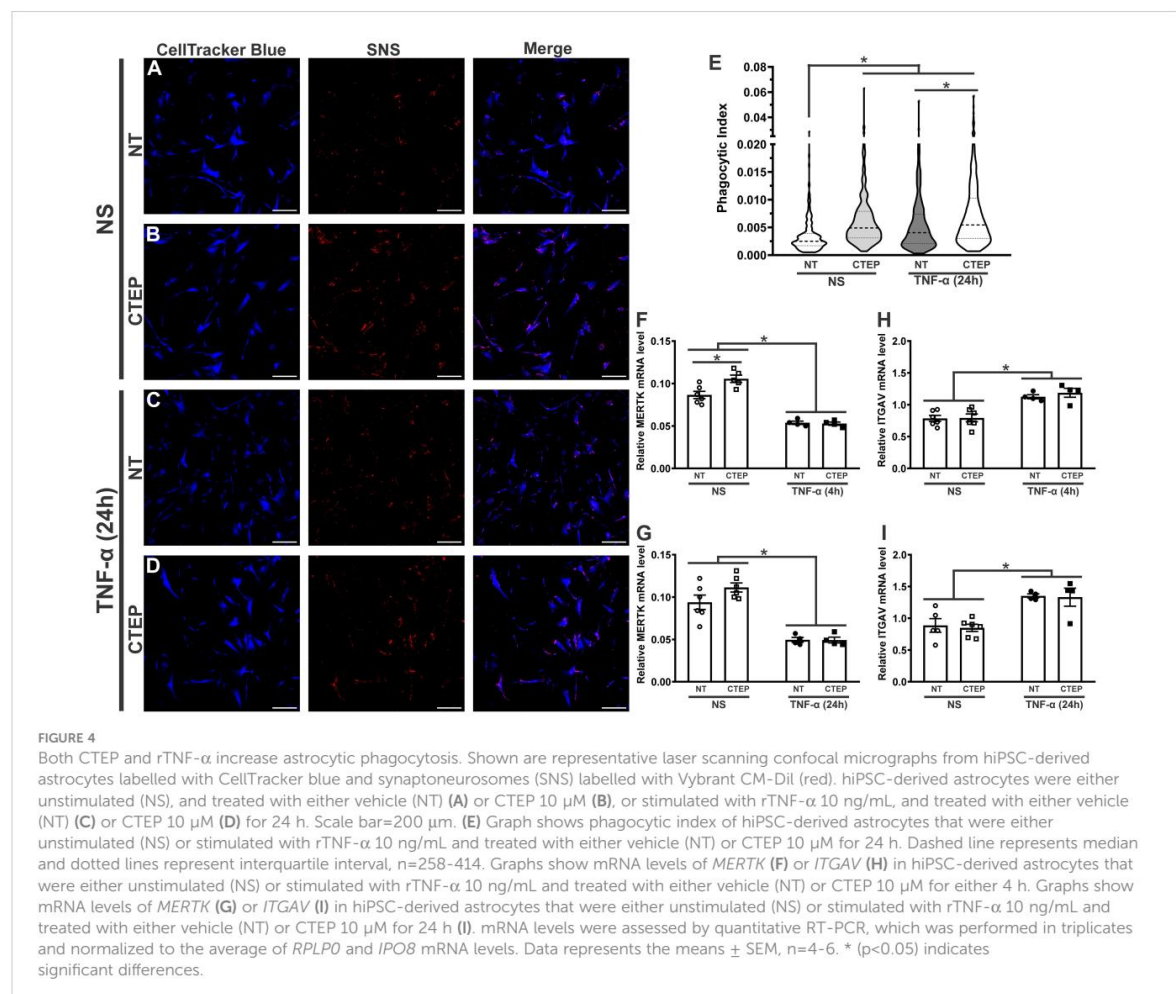
mGluR5 blockade promotes a sustained upregulation of the reactive astrocyte marker *SERPINA3* under pro-inflammatory conditions, without changing the expression of A1- and A2-reactive markers.

3.3 CTEP treatment leads to enhanced synaptic material engulfment by human astrocytes

It has been shown that astrocyte reactivity affects its capacity to uptake synaptic material (52). Then, we decided to develop an assay to assess synaptic material phagocytosis by the hiPSC-derived astrocytes. First, we isolated synaptoneurosomes from mouse brain and evaluated if this procedure was effective in enriching both pre- and post-synaptic proteins. As seen in **Supplementary Figure S4**, both syntaxin-1 and Homer, respectively, pre- and postsynaptic markers, were enriched in the synaptoneurosomes fraction, while vinculin, a cytoskeleton protein, was mostly confined to the cytosolic compartment. Afterwards, we investigated whether the hiPSC-derived astrocytes could engulf

fluorescently-labeled synaptoneurosomes. Human astrocytes were capable to engulf synaptic material, as several red *puncta*, corresponding to fluorescently-labeled synaptoneurosomes, were observed inside the astrocyte cell bodies (**Supplementary Figure S5** and **Movie S1**).

rTNF- α stimulation significantly increased astrocytic phagocytosis compared to non-stimulated cells (**Figures 4A, C, E**). As both rTNF- α and CTEP modified the expression of reactive astrocyte markers, next we analyzed whether mGluR5 blockade influences astrocytic phagocytosis. CTEP treatment led to enhanced synaptoneurosomal phagocytosis in human astrocytes in basal (no rTNF- α) conditions (**Figures 4A, B, E**). Interestingly, CTEP-treated astrocytes stimulated with rTNF- α showed even higher synaptic material engulfment (**Figures 4C–E**). In addition, both non-stimulated and rTNF- α -stimulated astrocytes that were pre-treated with 10 μ M CTEP displayed similar synaptoneurosomal phagocytic level (**Figures 4B, D, E**). These data suggest that blocking mGluR5 activity is enough to enhance synaptic material engulfment by human astrocytes, even in the absence of proinflammatory stimulation.



Tyrosine-protein kinase mer (MERTK) and $\alpha\beta3/5$ integrin, composed by the alpha chain V (ITGAV) and the beta 3/5 components, have been identified as important phagocytic receptors responsible for promoting synapse and myelin engulfment by astrocytes (10, 54, 55). Thus, we analyzed the expression of these receptors in human astrocytes upon rTNF- α stimulation and mGluR5 pharmacological inhibition. CTEP treatment increased *MERTK* gene expression in human astrocytes in basal conditions and this difference was statistically significant at the 4 h timepoint (Figures 4F, G). Conversely, rTNF- α stimulation reduced *MERTK* mRNA levels (Figures 4F, G), at the same time it enhanced *ITGAV* expression (Figures 4H, I) in all treatment groups at both 4 h and 24 h post-stimulation. CTEP treatment did not modify *ITGAV* expression (Figures 4H, I). Therefore, different phagocytic receptors might be involved in TNF- α - and mGluR5-induced phagocytosis by astrocytes.

3.4 rTNF- α stimulation and mGluR5 blockade decrease the expression of synaptogenic molecules in human astrocytes

The activation of mGluR5 can induce the expression of synaptogenic factors by astrocytes and promote synapse remodeling (30, 56, 57). To investigate whether mGluR5 could modulate the expression of synaptogenic molecules in an inflammatory context, hiPSC-derived astrocytes were subjected to rTNF- α stimulation for 4 h and 24 h followed by the analysis of gene expression of the synaptogenic factors *BDNF*, *GPC4* and *TSP1*. rTNF- α -stimulated astrocytes displayed reduced *BDNF* and *GPC4* mRNA levels at both timepoints (Figures 5A–D). *TSP1* expression,

on the other hand, was not affected by rTNF- α stimulation (Figures 5E, F). Furthermore, CTEP treatment had no impact in *BDNF* and *GPC4* expression when human astrocytes were subjected to rTNF- α stimulation (Figures 5A–D). However, CTEP treatment led to a reduction in *BDNF* expression under basal conditions (no rTNF- α) and this difference was significant in the case of the 4 h timepoint (Figures 5A, B). In addition, CTEP drove a reduction in *TSP1* gene expression, which was significantly different in the case of the 24 h timepoint (Figures 5E, F). Interestingly, this effect was observed regardless of rTNF- α -stimulation, indicating that mGluR5 antagonism alone is responsible for decreasing *TSP1* expression (Figure 5F). Altogether, these data indicate that both pro-inflammatory stimulation and mGluR5 negative allosteric modulation can dampen the production of synaptogenic molecules, which may contribute to the synaptic deficits often seen in neurodegenerative disorders (58, 59).

4 Discussion

It is well known that mGluR5 is involved in neuroinflammation and neurodegeneration processes and has hence been pointed as a potential pharmacological target for neuroprotection in a variety of neurodegenerative diseases (60). However, the literature has provided conflicting information concerning whether activation of neuronal mGluR5 is either neuroprotective or neurotoxic and whether mGluR5 stimulation in astrocytes would elicit protective or toxic effects on neighbouring cells. While some studies have reported positive effects of astrocytic mGluR5 activation following injury through the actions of growth factors and synaptogenic molecules (29, 30), others have shown that activation of this receptor may elicit harmful effects through the production of

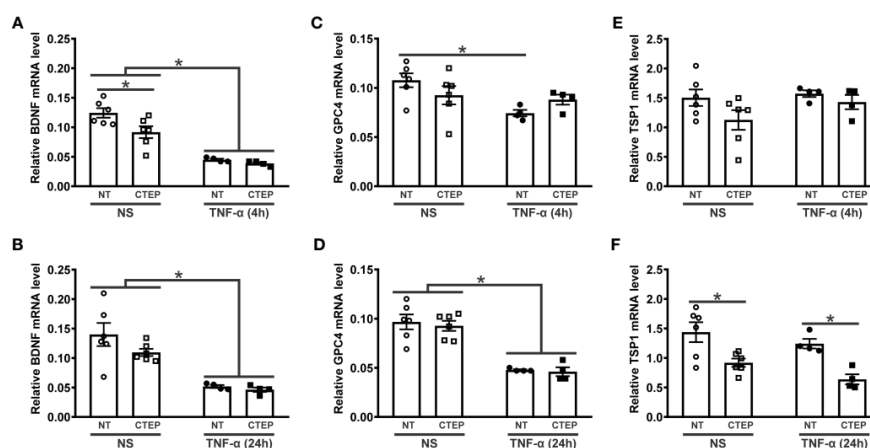


FIGURE 5
Both CTEP and rTNF- α decrease the expression of synaptogenic molecules. Graphs show mRNA levels of BDNF (A), glypican-4 (GPC4) (C), and trombospondin-1 (TSP1) (E) in hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 4 h. Graphs show mRNA levels of BDNF (B), GPC4 (D), and TSP1 (F) in hiPSC-derived astrocytes that were either unstimulated (NS) or stimulated with rTNF- α 10 ng/mL and treated with either vehicle (NT) or CTEP 10 μ M for 24 h. mRNA levels were assessed by quantitative RT-PCR, which was performed in triplicates and normalized to the average of RPLP0 and IPO8 mRNA levels. Data represents the means $\pm$ SEM, n=4–6. * ($p < 0.05$) indicates significant differences.

cytokines and inflammatory mediators (31, 32). Actually, it is possible that the utility of agonists or antagonists of the receptor may vary based on the underlying condition. For instance, stimulation of mGluR5 in astrocytes can lead to BDNF release, which supports myelin protein synthesis in the cuprizone-induced demyelination mouse model (30). On the other hand, in the case of AD, it was demonstrated that A β induces an increase in intracellular Ca²⁺ levels, which can be explained, at least in part, by an increase in mGluR5 expression in astrocytes (26, 61–65). Thus, in this case, mGluR5 antagonism is efficient to reverse Ca²⁺ rise, preventing A β -induced astrocytic Ca²⁺ signalling dysfunction (61, 63, 65). Moreover, mGluR5 blockade in cultured astrocytes derived from hSOD1^{G93A}, a transgenic mouse model of ALS, was shown to prevent cell death (31). Our results may shed some light on this dichotomy, as we showed that mGluR5 blockade by CTEP decreased the levels of inflammatory factors following short rTNF- α stimulation, with this effect wearing off at 24 h. This is in line with previous reports showing that mGluR5 antagonism prevents the secretion of IL-8 and IL-6 in an astrocytic cell line (32). However, it is surprising that CTEP augmented the gene expression of *SERPINA3*, which is a marker of reactive astrocytes. In addition, CTEP reduced the expression of trophic and synaptogenic molecules, such as *BDNF* and *TSP1*, and did not modify the expression of A1 and A2 reactive astrocyte markers.

Astrocytes play pivotal roles in neuronal survival and synapse remodelling by secreting trophic and synaptogenic factors, including *BDNF* (11), *GPC4* (12), hevin (13), and *TSP* (14). We showed that rTNF- α stimulation decreased the levels of *BDNF* and *GPC4*, without modifying *TSP1* mRNA levels. A previous study has shown that murine A1 astrocytes, under distinct inflammatory stimuli (IL-1 α 3 ng/mL, TNF- α 30 ng/mL, and C1q 400 ng/mL), exhibit increased levels of *GPC4* and *TSP1/2* (52). While these contrasting results could be explained by differences in inflammatory stimuli, it is also possible that murine and human iPSC-derived astrocytes respond differently to inflammation, highlighting the importance of employing cell models relevant to humans. Interestingly, Although CTEP had an anti-inflammatory effect, mGluR5 blockade did not result in an increase in the expression of the aforementioned synaptogenic factors. In fact, CTEP decreased *BDNF* and *TSP-1* expression levels, which could contribute to further attenuation of synaptogenesis. These results were anticipated, as it has been shown that astrocytic mGluR5 is necessary for glypican-4, *BDNF* and *TSP1* secretion (30, 56, 57). In the case of *BDNF*, it has been shown that mGluR5 activation enhances the expression of this trophic factor by increasing the phosphorylation of CREB (66–69). In addition, previous data from our laboratory showed that mGluR5 genetic ablation leads to reduced dendritic spine numbers in a Huntington's disease mouse model (58), while mGluR5 positive allosteric modulation is capable of rescuing this phenotype (69), indicating that mGluR5 stimulation is synaptogenic. Thus, both rTNF- α and mGluR5 blockade may impair synaptogenesis and future studies will be important to determine whether either astrocyte conditioned media or co-culture of these astrocytes with neurons would lead to decreased number of synapses in human cells.

Phagocytosis is important to eliminate dead cells in both physiological and pathological conditions of the CNS. Synapses and myelin are also eliminated by phagocytosis to maintain or refine neural networks during development and adulthood (6, 7). However, aberrant synapse pruning by microglia is suggested to cause undesired synapse loss in AD (8). Although microglia play a major role in phagocytosis, astrocytes also prune synapses by phagocytosis in the developing brain and take up extracellular protein aggregates, such as A β (9, 10). In fact, recent findings indicate that hippocampal synapses are preferentially phagocytosed by astrocytes (70). In a mouse model of AD (APP/PS1 mice), dysfunctional synapses are engulfed by A β -associated astrocytes, but not microglia (71). However, this beneficial effect is limited, as progressive accumulation of A β impairs the phagocytosis of dystrophic synapses by astrocytes and decreases the expression of the phagocytic receptors *MERTK* and *MEGF10* (72, 73). Even though healthy synapses should be preserved, accumulation of faulty synapses can result in an unhealthy synaptic environment, causing alterations in circuit connectivity consequent cognitive impairment and memory loss. The results shown here demonstrate that rTNF- α enhanced phagocytosis by astrocytes and increased the expression of the integrin alpha chain V, encoded by *ITGAV*, which is part of the phagocytic receptor $\alpha v \beta 3/5$ integrin (54), whereas *MERTK* expression was decreased. In contrast, murine A1 astrocytes under inflammatory stimuli (IL-1 α , TNF- α , and C1q) exhibit suppressed phagocytic activity for synapses and myelin, concomitantly with downregulation of the phagocytic receptors *MERTK* and *MEGF10* (52). These data suggest that the combination of different inflammatory factors might produce contrasting results on the phagocytic activity of astrocytes, adding to the debate of whether this simplified dichotomic classification of astrocytes into A1 and A2 is enough to fully describe the myriad of phenotypes astrocytes can display (44).

Not many studies have addressed the role of mGluR5 on astrocytic phagocytosis. A recent study shows that a silent allosteric modulator (SAM) of mGluR5 prevents synaptic localization of the complement component C1q and synaptic engulfment by astrocytes in an AD mouse model (59). Here we show that CTEP treatment enhanced phagocytosis in the presence and in the absence of rTNF- α . However, although CTEP increased the expression of *MERTK* in the absence of rTNF- α , *MERTK* expression remained reduced in the presence of this inflammatory factor. This increase in *MERTK* expression by CTEP is in line with the enhanced phagocytosis observed in astrocytes treated with CTEP. Thus, CTEP seems to have a prominent effect to induce phagocytosis, regardless of the presence of rTNF- α . Considering that phagocytosis by microglia (74) and astrocytes (72) decline in certain diseases, including AD, CTEP could be an option to compensate impaired phagocytic clearance of A β and dystrophic synapses in AD and in other brain disorders caused by protein aggregates.

In conclusion, mGluR5 blockade by CTEP attenuates the rTNF- α -induced secretion of inflammatory factors, including IL-6 and IL-8 in the short-term, although this effect subsides with time. At the

same time, CTEP treatment did not modify either A1 or A2 astrocytic markers, while rTNF- α led to an increase in the A1 markers, *C3*, *VCAM-1* and *GBP2*. *SERPINA3* expression and astrocyte phagocytosis were enhanced by both CTEP and rTNF- α , whereas the expression of synaptogenic factors were decreased. Thus, CTEP treatment could be an option when augmented phagocytosis is desired, although it might lead to increased synaptic pruning and diminished synaptogenesis. These data illustrate the complexity of mGluR5 pharmacology and show that the simplified classification of reactive astrocytes into A1 and A2 falls short of capturing their phenotypic diversity.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

Ethical approval was not required for the studies on humans in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used. The animal study was approved by Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais (CEUA #120/2017). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

IL: Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Investigation, Methodology. PC: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. JF: Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. JL: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. AM: Writing – review & editing, Investigation, Data curation, Conceptualization, Resources, Supervision. AT: Writing – review & editing, Investigation, Data curation, Conceptualization, Supervision. FR: Writing – review & editing, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft.

References

1. Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discovery* (2022) 21:339–58. doi: 10.1038/s41573-022-00390-x
2. de Lima IBQ, Ribeiro FM. The implication of glial metabotropic glutamate receptors in alzheimer's disease. *Curr Neuroparmacol* (2023) 21:164–82. doi: 10.2174/1570159X20666211223140303
3. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev* (2018) 98:239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016
4. Moulson AJ, Squair JW, Franklin RJM, Tetzlaff W, Assinck P. Diversity of reactive astrogliosis in CNS pathology: heterogeneity or plasticity? *Front Cell Neurosci* (2021) 15:703810. doi: 10.3389/fncel.2021.703810
5. Verkhratsky A, Li B, Scuderi C, Parpura V. Principles of astroglipathology. *Adv Neurobiol* (2021) 26:55–73. doi: 10.1007/978-3-030-77375-5_3
6. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* (2002) 420:788–94. doi: 10.1038/nature01273

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research was funded by CNPq, grant number 441719/2020-1, FAPEMIG, grant numbers APQ-03921-22 and BPD-00067-22, and PRPG/PRPq-UFMG.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Center for Acquisition and Processing of Images (CAPI/ICB/UFMG) for providing the equipment for experiments involving confocal images.

Conflict of interest

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

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1283331/full#supplementary-material>

7. Paolicelli RC, Bolascho G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* (2011) 333:1456–8. doi: 10.1126/science.1202529
8. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* (2016) 352:712–6. doi: 10.1126/science.aad8373
9. Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* (2004) 10:719–26. doi: 10.1038/nm1058
10. Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* (2013) 504:394–400. doi: 10.1038/nature12776
11. Gomez-Casati ME, Murtie JC, Rio C, Stankovic K, Liberman MC, Corfas G. Nonneuronal cells regulate synapse formation in the vestibular sensory epithelium via erbB-dependent BDNF expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2010) 107:17005–10. doi: 10.1073/pnas.1008938107
12. Allen NJ, Bennett ML, Foo LC, Wang GX, Chakraborty C, Smith SJ, et al. Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* (2012) 486:410–4. doi: 10.1038/nature11059
13. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, et al. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2011) 108:E440–449. doi: 10.1073/pnas.1104977108
14. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullenow CE, Hell JW, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* (2005) 120:421–33. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020
15. Ribeiro FM, Vieira LB, Pires RG, Olmo RP, Ferguson SS. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* (2017) 115:179–91. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.013
16. Miller S, Romano C, Cotman CW. Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes. *J Neurosci* (1995) 15:6103–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-09-06103.1995
17. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* (1997) 17:7817–30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-20-07817.1997
18. Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tolle TR, Gebicke-Harter PJ, et al. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J Neurochem* (1999) 72:1671–80. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721671.x
19. Paquet M, Ribeiro FM, Guadagno J, Esseltine JL, Ferguson SS, Cregan SP. Role of metabotropic glutamate receptor 5 signaling and homer in oxygen glucose deprivation-mediated astrocyte apoptosis. *Mol Brain* (2013) 6:9. doi: 10.1186/1756-6606-6-9
20. Peavy RD, Conn PJ. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat cortical glia by stimulation of metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* (1998) 71:603–12. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.7102603.x
21. Servitja JM, Masgrau R, Sarri E, Picatoste F. Group I metabotropic glutamate receptors mediate phospholipase D stimulation in rat cultured astrocytes. *J Neurochem* (1999) 72:1441–7. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721441.x
22. Cai Z, Schools GP, Kimelberg HK. Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of mGluR5 mRNA and functional expression. *Glia* (2000) 29:70–80. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(20000101)29:1<70::AID-GLIA>3.0.CO;2-V
23. Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W, et al. Glutamate-dependent neuregulin calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* (2013) 339:197–200. doi: 10.1126/science.1226740
24. Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D. Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience* (2001) 105:509–20. doi: 10.1016/S0304-4522(01)00181-6
25. Geurts JJ, Wolszijk G, Bo L, van der Valk P, Polman CH, Troost D, et al. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain* (2003) 126:1755–66. doi: 10.1093/brain/awg179
26. Shrivastava AN, Kowalewski JM, Renner M, Bousset L, Koulakoff A, Melki R, et al. beta-amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors. *Glia* (2013) 61:1673–86. doi: 10.1002/glia.22548
27. Byrnes KR, Stoica B, Loane DJ, Riccio A, Davis MI, Faden AI. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. *Glia* (2009) 57:550–60. doi: 10.1002/glia.20783
28. Loane DJ, Stoica BA, Pajohesh-Ganji A, Byrnes KR, Faden AI. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. *J Biol Chem* (2009) 284:15629–39. doi: 10.1074/jbc.M806139200
29. Fulmer CG, VonDrán MW, Stillman AA, Huang Y, Hempstead BL, Dreyfus CF. Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci* (2014) 34:8186–96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014
30. Saitta KS, Lercher LD, Sainato DM, Patel A, Huang Y, McAuliffe G, et al. CHPG enhances BDNF and myelination in cuprizone-treated mice through astrocytic metabotropic glutamate receptor 5. *Glia* (2021) 69:1950–65. doi: 10.1002/glia.24003
31. Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, et al. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* (2008) 15:1691–700. doi: 10.1038/cdd.2008.99
32. Shah A, Silverstein PS, Singh DP, Kumar A. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5, AKT/PI3K signaling and NF-kappaB pathway in methamphetamine-mediated increase in IL-6 and IL-8 expression in astrocytes. *J Neuroinflamm* (2012) 9:52. doi: 10.1186/1742-2094-9-52
33. Kim H, Woo JH, Lee JH, Joe EH, Jou I. 22(R)-hydroxycholesterol induces HuR-dependent MAP kinase phosphatase-1 expression via mGluR5-mediated Ca(2+)/PKCalpha signaling. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1859:1056–70. doi: 10.1016/j.bbarm.2016.05.008
34. Aronica E, Gorter JA, Rozemuller AJ, Yankaya B, Troost D. Activation of metabotropic glutamate receptor 3 enhances interleukin (IL)-1beta-stimulated release of IL-6 in cultured human astrocytes. *Neuroscience* (2005) 130:927–33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.024
35. Li J, Pan L, Pembroke WG, Rexach JE, Godoy MI, Condro MC, et al. Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nat Commun* (2021) 12:3958. doi: 10.1038/s41467-021-24232-3
36. Degl'Innocenti E, Dell'Anno MT. Human and mouse cortical astrocytes: a comparative view from development to morphological and functional characterization. *Front Neuroanat* (2023) 17:1130729. doi: 10.3389/fnana.2023.1130729
37. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* (2013) 12:487–96. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.009
38. Trindade P, Loliola EC, Gasparotto J, Ribeiro CT, Cardozo PL, Devalle S, et al. Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes. *Glia* (2020) 68:1396–409. doi: 10.1002/glia.23786
39. Zhao J, Fu Y, Yamazaki Y, Ren Y, Davis MD, Liu CC, et al. APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nat Commun* (2020) 11:5540. doi: 10.1038/s41467-020-19264-0
40. Leng K, Rose IVL, Kim H, Xia W, Romero-Fernandez W, Rooney B, et al. CRISPRi screens in human iPSC-derived astrocytes elucidate regulators of distinct inflammatory reactive states. *Nat Neurosci* (2022) 25:1528–42. doi: 10.1038/s41593-022-01180-9
41. Tsenova L, Bergtold A, Freedman VH, Young RA, Kaplan G. Tumor necrosis factor alpha is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1999) 96:5657–62. doi: 10.1073/pnas.96.10.5657
42. Klein RS, Garber C, Howard N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. *Nat Immunol* (2017) 18:132–41. doi: 10.1038/ni.3656
43. Lindemann L, Jaeschke G, Michalon A, Vieira E, Honer M, Spooren W, et al. CTEP: a novel, potent, long-acting, and orally bioavailable metabotropic glutamate receptor 5 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* (2011) 339:474–86. doi: 10.1124/jpet.111.185660
44. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* (2021) 24:312–25. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4
45. Cardozo PL, de Lima IBQ, Maciel EMA, Silva NC, Dobransky T, Ribeiro FM. Synaptic elimination in neurological disorders. *Curr Neuropsychopharmacol* (2019) 17:1071–95. doi: 10.2174/1570159X17666190603170511
46. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy EA, Paquet D, Duffield M, et al. A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP beta-CTFs, Not Abeta. *Neuron* (2019) 104:256–270.e255. doi: 10.1016/j.neuron.2019.07.010
47. Molla Kazemiha V, Shokrozar MA, Arabestani MR, Shojaei Moghadam M, Azari S, Maleki S, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasma infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology* (2009) 61:117–24. doi: 10.1007/s10616-010-9252-6
48. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:71–4. doi: 10.1093/nar/gkm306
49. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* (2010) 8:e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412
50. Villasana LE, Klann E, Tejada-Simon MV. Rapid isolation of synaptosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Methods* (2006) 158:30–6. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.008
51. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* (2012) 32:6391–410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012
52. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* (2017) 541:481–7. doi: 10.1038/nature21029

53. Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int* (2021) 148:105080. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105080
54. Mills EA, Davis CH, Bushong EA, Boassa D, Kim KY, Ellisman MH, et al. Astrocytes phagocytose focal dystrophies from shortening myelin segments in the optic nerve of *Xenopus laevis* at metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2015) 112:10509–14. doi: 10.1073/pnas.1506486112
55. Konishi H, Koizumi S, Kiyama H. Phagocytic astrocytes: Emerging from the shadows of microglia. *Glia* (2022) 70:1009–26. doi: 10.1002/glia.24145
56. Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, et al. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest* (2016) 126:1983–97. doi: 10.1172/JCI82859
57. Danjo Y, Shigetomi E, Hirayama YJ, Kobayashi K, Ishikawa T, Fukazawa Y, et al. Transient astrocytic mGluR5 expression drives synaptic plasticity and subsequent chronic pain in mice. *J Exp Med* (2022) 219. doi: 10.1084/jem.20210989
58. de Souza JM, Ferreira-Vieira TH, Maciel EMA, Silva NC, Lima IBQ, Doria JG, et al. mGluR5 ablation leads to age-related synaptic plasticity impairments and does not improve Huntington's disease phenotype. *Sci Rep* (2022) 12:8982. doi: 10.1038/s41598-022-13029-z
59. Spurrier J, Nicholson L, Fang XT, Stoner AJ, Toyonaga T, Holden D, et al. Reversal of synapse loss in Alzheimer mouse models by targeting mGluR5 to prevent synaptic tagging by C1Q. *Sci Transl Med* (2022) 14:eabi8593. doi: 10.1126/scitranslmed.abi8593
60. Spampinato SF, Copani A, Nicoletti F, Sortino MA, Caraci F. Metabotropic glutamate receptors in glial cells: A new potential target for neuroprotection? *Front Mol Neurosci* (2018) 11:414. doi: 10.3389/fnmol.2018.00414
61. Casley CS, Lakics V, Lee HG, Broad LM, Day TA, Cluett T, et al. Up-regulation of astrocyte metabotropic glutamate receptor 5 by amyloid-beta peptide. *Brain Res* (2009) 1260:65–75. doi: 10.1016/j.brainres.2008.12.082
62. Lim D, Iyer A, Ronco V, Grolla AA, Canonico PL, Aronica E, et al. Amyloid beta deregulates astroglial mGluR5-mediated calcium signaling via calcineurin and Nf-kB. *Glia* (2013) 61:1134–45. doi: 10.1002/glia.22502
63. Grolla AA, Fakhfouri G, Balzaretto G, Marcello E, Gardoni F, Canonico PL, et al. Abeta leads to Ca(2+)-signaling alterations and transcriptional changes in glial cells. *Neurobiol Aging* (2013) 34:511–22. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.005
64. Grolla AA, Sim JA, Lim D, Rodriguez JJ, Genazzani AA, Verkhratsky A. Amyloid-beta and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. *Cell Death Dis* (2013) 4:e623. doi: 10.1038/cddis.2013.145
65. Ronco V, Grolla AA, Glasnov TN, Canonico PL, Verkhratsky A, Genazzani AA, et al. Differential deregulation of astrocytic calcium signalling by amyloid-beta, TNFalpha, IL-1beta and LPS. *Cell Calcium* (2014) 55:219–29. doi: 10.1016/j.ceca.2014.02.016
66. Mao L, Wang JQ. Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in cultured striatal neurons by metabotropic glutamate receptor subtype 5. *J Neurochem* (2003) 84:233–43. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01256.x
67. Wang H, Zhuo M. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front Pharmacol* (2012) 3:189. doi: 10.3389/fphar.2012.00189
68. Doria JG, de Souza JM, Andrade JN, Rodrigues HA, Guimaraes IM, Carvalho TG, et al. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* (2015) 73:163–73. doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.021
69. Doria JG, de Souza JM, Silva FR, Olmo IG, Carvalho TG, Alves-Silva J, et al. The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* (2018) 147:222–39. doi: 10.1111/jnc.14555
70. Lee JH, Kim JY, Noh S, Lee H, Lee SY, Mun JY, et al. Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. *Nature* (2021) 590:612–7. doi: 10.1038/s41586-020-03060-3
71. Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nunez-Diaz C, Sanchez-Varo R, et al. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* (2018) 66:637–53. doi: 10.1002/glia.23270
72. Iram T, Trudler D, Kain D, Kanner S, Galron R, Vassar R, et al. Astrocytes from old Alzheimer's disease mice are impaired in Abeta uptake and in neuroprotection. *Neurobiol Dis* (2016) 96:84–94. doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.001
73. Sanchez-Mico MV, Jimenez S, Gomez-Arboledas A, Munoz-Castro C, Romero-Molina C, Navarro V, et al. Amyloid-beta impairs the phagocytosis of dystrophic synapses by astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia* (2021) 69:997–1011. doi: 10.1002/glia.23943
74. Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, et al. Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PloS One* (2013) 8:e60921. doi: 10.1371/journal.pone.0060921