

Inês Alexandra Figueiredo de Almeida

# EFEITO *in vitro* DA BETAMETASONA E DA DEXAMETASONA NA MICROGLIA

Relação estrutura-atividade

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**EFEITO *in vitro* DA BETAMETASONA E DA DEXAMETASONA NA  
MICROGLIA**

RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Inês Alexandra Figueiredo de Almeida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab* do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, sobre supervisão científica do Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro e co-supervisão da Doutora Catarina Alexandra Reis Vale Gomes.

Universidade de Coimbra

2018





FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



MICRÓPSYN

O trabalho experimental realizado nesta dissertação foi realizado no laboratório *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab*, no Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.

O apoio financeiro foi garantido por FCT (UID/NEU/04539/2013), COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440), Centro 2020 (CENTRO-01-0145-FEDER-000008: BrainHealth 2020).



## **À minha família**

*“Procurai deixar o mundo um pouco melhor de que o encontrastes e quando vos chegar a vez de morrer, podeis morrer felizes sentindo que ao menos não desperdiçastes o tempo e fizestes todo o possível por praticar o bem.”*

Baden-Powell



---

**AGRADECIMENTOS**





Uma dissertação é um trabalho individual, mas resulta da partilha e da vivência com todas as pessoas que fazem parte da minha vida. Chegou agora a hora de lhes agradecer por tudo o que fazem por mim.

Ao Professor Doutor Fontes Ribeiro, orientador desta dissertação, quero agradecer por ter confiado e acreditado em mim, endereçando-me o convite para a realização deste trabalho. Uma oportunidade única! É sem dúvida um exemplo de trabalho e dedicação a seguir. Muito obrigada!

À Doutora Catarina Gomes, co-orientadora desta dissertação, quero agradecer toda a amabilidade que teve para comigo! Obrigada por todas as críticas e opiniões, fizeram-me crescer e tornaram-me mais perspicaz. É uma referência a ter em conta neste mundo da Ciência. Estou-lhe sem dúvida muito grata!

Agradeço também à Catarina Neves por partilhar comigo os seus conhecimentos! Obrigada por todo o tempo que me deste. Sem dúvida que com as tuas explicações tudo se tornou mais simples! Aproveito para pedir desculpa se por vezes possa ter sido inoportuna.

Ao Doutor Francisco Ambrósio, agradeço por me ter permitido realizar todas as experiências desta dissertação no seu laboratório.

Ao Departamento de Química da Universidade de Coimbra, por ter sido a minha segunda casa nestes últimos 5 anos. Obrigada!

À Filipa Batista, à Carla Henriques, à Rita Gaspar e restantes membros do grupo *Micropsyn*. Obrigada por todos os conhecimentos que partilhamos e discussões científicas que tivemos, essencialmente nos *Brain Crackers*. Sem dúvida que me tornaram muito mais madura! Cresci cientificamente com vocês!

A todos os que fazem parte do *Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab*, obrigada! Às horas de almoço, aos lanches e a todos os momentos que partilhamos! Sem dúvida que trabalhar no laboratório é muito mais fácil quando nos sentimos bem. Sabem ser bastante acolhedores, nunca se esqueçam!

A Coimbra, e a estes últimos 5 anos que partilhamos juntas! É mesmo verdade que “Quem te não viu anda cego/ Quem te não ama não vive”. Agradeço também a todos os amigos que Coimbra me permitiu fazer. À Beatriz, por toda a vida

académica que partilhamos. Partilhamos muito bons momentos, não só a estudar como nas horas vagas. Obrigada por estar sempre lá quando é preciso!

Aos amigos de sempre e para sempre! À Jéssica e ao Miguel que, mesmo não estando todos os dias, nada muda. A amizade permanece independentemente da distância!

A todos as minhas alunas e alunos ao longo destes anos. Obrigada por nunca me fazerem esquecer da minha outra paixão, a Dança! As crianças são sem dúvida o melhor do mundo!

Ao Rafael, por ser a melhor pessoa que podia ter ao meu lado! Por tudo o que contribuístes para a realização deste trabalho; por todas as vindas a Coimbra fora de horas, por todos os desabafos e acima de tudo pelo desenho que realizaste para a capa desta dissertação. Completas-me!

Por último, mas não menos importante quero agradecer aos meus pais e à minha família! Aos meus pais, obrigada pela educação que me deram e por estarem comigo todos os dias. Obrigada por me permitirem ser quem sou. São sem dúvida a minha inspiração e o meu orgulho! Aos meus avós, aos meus tios e tias e aos meus primos e primas. Sem dúvida que com uma família unida tudo se torna mais simples. À Alice e ao Vicente por serem ainda tão pequeninos e já me permitirem partilhar a minha vida com eles.

Obrigada a todos por ficarem tao vaidosos e felizes por cada conquista minha! Esta dissertação é só mais uma!





## Comunicações Orais

C. Henriques; J. Duarte; H. Pinheiro; R. Gaspar; **I. Almeida**; P. Patrício; A. Mateus-Pinheiro; N. Alves; B. Coimbra; S. Henriques; C. Cunha; C. A. Ribeiro; N. Sousa; R. A. Cunha; A. J. Rodrigues; L. Pinto; A. F. Ambrósio; C. A. Gomes. ***Chronic blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: gender-specific reprogramming of microglia morphology in the PFC.*** XV Reunião da Sociedade Portuguesa de Neurociências. Comunicação Oral. 25-26 maio 2017, Braga, Portugal.

**I. Almeida**; C. Neves; C. Henriques; R. Gaspar; A. F. Ambrósio; C. A. Ribeiro; C. A. Gomes. ***Effects of dexamethasone and betamethasone on brain microglia: structure-activity correlation study.*** XLVIII Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia. Comunicação Oral. 5-7 fevereiro 2018, Lisboa, Portugal.

C. Henriques; R. Gaspar; **I. Almeida**; C. A. Fontes-Ribeiro; A. F. Ambrósio; C. A. Gomes. ***Masculinizing female anxious-like behaviour: organizational instructions in transgender experiments.*** XLVIII Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia. Comunicação Oral. 5-7 fevereiro 2018, Lisboa, Portugal.

**I. Almeida**; C. Neves; C. Henriques; A. F. Ambrósio; C. A. Ribeiro; C. A. Gomes. ***In vitro effects of dexamethasone and betamethasone on microglia: structure-activity correlation study.*** III Encontro Científico do Núcleo de Estudante de Química da Associação Académica de Coimbra. Comunicação Oral. 21-22 fevereiro 2018, Coimbra, Portugal.

C. Henriques; R. Gaspar; **I. Almeida**; C. A. Fontes-Ribeiro; A. F. Ambrósio; C. A. Gomes. ***Organizational effect of testosterone: masculinizing anxious-like behaviour and microglia morphology in the prefrontal cortex.*** III Encontro Científico do Núcleo de Estudante de Química da Associação Académica de Coimbra. Comunicação Oral. 21-22 fevereiro 2018, Coimbra, Portugal.

## Sessões de Posters

C. Henriques; J. Duarte; H. Pinheiro; R. Gaspar; **I. Almeida**; P. Patrício; A. Mateus-Pinheiro; N. Alves; B. Coimbra; S. Henriques; C. Cunha; C. A. Ribeiro; N. Sousa; R. A. Cunha; A. J. Rodrigues; L. Pinto; A. F. Ambrósio; C. A. Gomes. **Chronic blockade of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: gender-specific reprogramming of microglia morphology in the PFC.** XV Reunião da Sociedade Portuguesa de Neurociências. Comunicação Oral. 25-26 maio 2017, Braga, Portugal.

**I. Almeida**; C. Neves; C. Henriques; A. F. Ambrósio; C. A. Ribeiro; C. A. Gomes. **In vitro effects of dexamethasone and betamethasone on microglia: structure-activity correlation study.** III Encontro Científico do Núcleo de Estudante de Química da Associação Académica de Coimbra. Sessão de Posters. 21-22 fevereiro 2018, Coimbra, Portugal.

C. Henriques; R. Gaspar; **I. Almeida**; C. A. Fontes-Ribeiro; A. F. Ambrósio; C. A. Gomes. **Organizational effect of testosterone: masculinizing anxious-like behaviour and microglia morphology in the prefrontal cortex.** III Encontro Científico do Núcleo de Estudante de Química da Associação Académica de Coimbra. Sessão de Posters. 21-22 fevereiro 2018, Coimbra, Portugal.

**I. Almeida**; C. Neves; C. Henriques; A. F. Ambrósio; C. A. Ribeiro; C. A. Gomes. **Regulation of microglia by glucocorticoids: comparative analysis between dexamethasone and betamethasone.** EMBO Workshop, Microglia 2018. Sessão de Posters. 18-21 março 2018, Heidelberg, Alemanha.







---

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxiii
RESUMO.....	xxix
ABSTRACT .....	xxxiii
RESUMO GRÁFICO .....	xxxvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, glucocorticóides e homeostase .....	3
1.1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal: do <i>stress</i> à homeostasia.....	3
1.1.2. Recetores mineralocorticóide e glucocorticóide .....	4
1.1.3. Recetor glucocorticóide e sua sinalização celular .....	5
1.1.4. O antagonista do recetor glucocorticóide .....	7
1.1.5. Desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal: impacto no desenvolvimento.....	7
1.2. Glucocorticóides sintéticos .....	8
1.2.1. Uma visão geral.....	9
1.2.2. Dexametasona e Betametasona .....	9
1.2.3. Glucocorticóides sintéticos na placenta .....	12
1.3. Microglia.....	14
1.3.1. Descoberta da microglia .....	14
1.3.2. Origem e desenvolvimento da microglia .....	15
1.3.3. Diferentes fenótipos de microglia durante a vida.....	15
1.3.4. A microglia e as suas funções no sistema nervoso central .....	16
1.3.5. Microglia e Neurónios .....	17
1.3.6. Sinalização recetor da fratalquina/fratalquina.....	18
1.4. Origem de doenças neuropsiquiátricas no desenvolvimento: a função do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, do recetor glucocorticóide e da microglia.....	19
CAPÍTULO 2: OBJETIVO .....	23
CAPÍTULO 3: MÉTODOS .....	27
3.1. Cultura de células da microglia.....	29
3.2. Tratamento farmacológico celular .....	29
3.3. Avaliação da viabilidade celular.....	30
3.3.1. Análise dos dados .....	31

3.4. Avaliação da densidade do recetor glucocorticóide e do recetor da fratalquina	31
3.4.1. Protocolo de extração e quantificação proteica .....	31
3.4.2. Protocolo de fracionamento celular e quantificação proteica .....	32
3.4.3. Desnaturação .....	33
3.4.4. Western Blot.....	33
3.4.5. Análise dos dados .....	35
3.5. Avaliação da expressão de marcadores de reatividade glial e de mediadores inflamatórios .....	35
3.5.1. Extração de ARN.....	36
3.5.2. Síntese de cADN.....	37
3.5.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real .....	37
3.5.4. Análise dos dados .....	39
3.6. Avaliação da capacidade fagocítica .....	39
3.6.1. Análise dos dados .....	40
CAPÍTULO 4: RESULTADOS .....	41
4.1. A exposição a dexametasona e a betametasona desencadeia a translocação do recetor glucocorticóide para o núcleo.....	43
4.2. A viabilidade da microglia não é afetada após exposição a dexametasona e a betametasona .....	44
4.3. A dexametasona e a betametasona diminuem a densidade do recetor glucocorticóide em extratos totais de células microgliais.....	45
4.4. A dexametasona e a betametasona aumentam a expressão dos marcadores de reatividade da microglia .....	46
4.5. A dexametasona e a betametasona aumentam a expressão de mediadores inflamatórios .....	50
4.6. A dexametasona e a betametasona não alteram a capacidade fagocítica ....	53
4.7. Apenas a dexametasona aumenta a densidade do recetor da fratalquina ....	55
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO .....	59
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO.....	69
CAPÍTULO 7: PERSPETIVAS FUTURAS .....	73
CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFIA .....	77

---

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**



**Lista de Figuras**

**Figura 1|** Eixo HPA e mecanismos de *feedback* negativos e positivos do cortisol. ....4

**Figura 2|** Representação dos mecanismos básicos de ação do RG. ....6

**Figura 3|** Representação da molécula de MIF. ....7

**Figura 4|** A - Representação da molécula de DEX; B - Representação da molécula de BET; C - Representação da molécula de cortisol; D - Representação da molécula de cortisona. ....10

**Figura 5|** A - Perspetiva lateral da estrutura cristalina de RG LBD no complexo com DEX; B - Interações entre a DEX e o RG (representação esquemática). ....11

**Figura 6|** Barreiras placentárias aos GC endógenos e sintéticos durante a gravidez. ....13

**Figura 7|** Ilustração do *pruning* sináptico nas dendrites dos neurónios por células microgliais. ....18

**Figura 8|** A função do eixo HPA, do RG e da microglia na origem de doenças neuropsiquiátricas. A CRH e os GC, através do eixo HPA, afetam a microglia. ....22

**Figura 9|** Representação esquemática do tratamento farmacológico da linha celular BV-2 com DEX, BET e MIF. ....30

**Figura 10|** Representação esquemática do protocolo RT-PCR utilizado, incluindo o perfil dos ciclos de temperatura em diferentes etapas. ....38

**Figura 11|** Efeito dos diferentes tempos de exposição à DEX (A) e à BET (B) na translocação do RG do citoplasma para o núcleo na linha celular microglial. ....43

**Figura 12|** Efeito da DEX, BET, MIF e da combinação dos fármacos na viabilidade da linha celular microglial após 6 (A) ou 24 horas (B) de exposição. ....44

**Figura 13|** Efeito da DEX e BET na densidade do RG em células da microglia. ....45

**Figura 14|** Efeito da exposição a DEX e BET na expressão do IBA-1, MHC-II, TSPO e do A<sub>2A</sub>R. ....47

**Figura 15|** Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na expressão de IBA-1, MHC-II, TSPO e do A<sub>2A</sub>R. ....49

**Figura 16|** Efeito da exposição a DEX e BET na expressão de TNF, iNOS e IL-10. ....51

**Figura 17|** Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na expressão de TNF, iNOS e IL-10. ....52

## Lista de Figuras e Tabelas

---

<b>Figura 18 </b> Efeito da exposição a DEX e BET na eficiência fagocítica e na razão entre células fagocíticas e número total de células. ....	54
<b>Figura 19 </b> Efeito da exposição a DEX e BET na expressão do TREM-2. ....	55
<b>Figura 20 </b> Efeito de DEX e BET na densidade do CX3CR1 em células da microglia. ....	56
<b>Figura 21 </b> Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na densidade do CX3CR1 em células da microglia.....	57

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1 </b> Características dos diferentes subtipos de células da microglia presentes no hipocampo de ratos ao longo da vida [DE (dia embrionário); DPN (dia pós-natal)]. ....	16
<b>Tabela 2 </b> Lista de anticorpos primários e secundários e respectivos substratos usados no WB.....	35
<b>Tabela 3 </b> Lista das sequências dos <i>primers</i> usados no RT-PCR. ....	38

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS**





<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrófica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APS</b>	Persulfato de amónio
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AVP</b>	Arginina vasopressina
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Recetor A <sub>2A</sub> da adenosina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BET</b>	Betametasona
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CAPS</b>	Ácido [3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfónico]
<b>cADN</b>	ADN complementar
<b>CRH</b>	Hormona libertadora de corticotrofina
<b>Ct</b>	Ciclo <i>Threshold</i>
<b>CX3CL1</b>	Fratalkuina
<b>CX3CR1</b>	Recetor da fratalkuina
<b>DAPI</b>	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida
<b>DEX</b>	Dexametasona
<b>DNase I</b>	Desoxirribonuclease I
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECF</b>	Quimiofluorescência
<b>ECL</b>	Quimiluminescência
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GC</b>	Glucocorticóides
<b>GRE</b>	Elementos de resposta aos glucocorticóides

## Lista de Abreviaturas

---

<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>HEPES</b>	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico
<b>HPA</b>	Hipotálamo-hipófise-suprarrenal
<b>Hsp</b>	Proteínas de choque térmico
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>Iba-1</b>	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase indutível
<b>LBD</b>	Domínio de ligação do ligando
<b>MHC-II</b>	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II
<b>MIF</b>	Mifepristona
<b>mARN</b>	ARN mensageiro
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>nGRE</b>	Elementos negativos de resposta aos glucocorticóides
<b>NIH</b>	Instituto Nacional de Saúde Americana
<b>NT</b>	Células controlo; sem tratamento farmacológico
<b>PBS</b>	Solução de tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>RG</b>	Recetor glucocorticóide
<b>RIPA</b>	Ensaio de radioimunoprecipitação
<b>RM</b>	Recetor mineralcorticóide
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
<b>SDR</b>	Síndrome do desconforto respiratório

<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TBS-T</b>	Solução tampão de Tris suplementado com polissorbato 20
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TP</b>	Transcriptase reversa
<b>TREM-2</b>	Recetor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2
<b>Tris</b>	Trisaminometano
<b>TSPO</b>	Proteína translocadora
<b>WB</b>	Western Blot
<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase



---

**RESUMO**



Estudos epidemiológicos e estudos em animais reportam o aumento do risco de doenças cardiovasculares, de doenças psiquiátricas, de distúrbios metabólicos e de disfunções neuroendócrinas durante a vida, após exposição a glucocorticóides sintéticos e mediação pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. Em casos de risco de parto prematuro são administrados às gestantes glucocorticóides sintéticos durante a gravidez, com o intuito de promover a maturação fetal pulmonar e reduzir o risco de morte neonatal. Os glucocorticóides sintéticos usados são a dexametasona e a betametasona, diastereoisómeros epímeros. De facto, trabalhos anteriores do nosso grupo demonstram que a administração pré-natal de dexametasona desencadeia um fenótipo do tipo ansioso nos ratos, correlacionado com alterações nas células da microglia.

As células da microglia, células imunes do sistema nervoso central, têm um papel crucial nestas fases precoces do neurodesenvolvimento, sendo responsáveis pela construção de uma rede neuronal saudável devido às suas capacidades de libertação de citocinas e de fagocitose de elementos celulares. De facto, o sistema imune tem sido correlacionado com alterações psiquiátricas, incluindo o desenvolvimento da depressão, o que evidencia ainda mais o papel destas células nas alterações mediadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal após exposição a glucocorticóides sintéticos.

O principal objetivo deste trabalho consiste em avaliar as funções fisiológicas das células da microglia tendo em conta a diferença estereoquímica entre os dois fármacos, dexametasona e betametasona. Pretende-se também identificar se as alterações produzidas pelos fármacos são mediadas pelo recetor glucocorticóide, sendo que estes fármacos são agonistas deste recetor.

Durante todo o trabalho foi usada uma linhagem de células da microglia, as BV-2. Estas foram incubadas com dexametasona e betametasona durante 6 e 24 horas, com o intuito de avaliar as células da microglia após uma curta e uma longa exposição aos glucocorticóides, respetivamente. De um modo geral, quer os marcadores de reatividade glial, quer os marcadores inflamatórios aumentam após incubação com os fármacos. No entanto, a capacidade fagocítica mantêm-se inalterada. Por sua vez, a densidade do recetor da fratalquina apenas é afetada após uma exposição de 6 horas à dexametasona. De facto, podemos concluir que as células da microglia estão num estado de ativação e são polarizadas num fenótipo M1, pró-inflamatório, após exposição a ambos os fármacos. No entanto, a comunicação microglia-neurónios, através do recetor da fratalquina, apenas é afetada pela dexametasona. Nem todos os efeitos provocados por estes fármacos são mediados pelo recetor glucocorticóide. De facto, apenas o aumento na expressão da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (IBA-1), do complexo



## *Resumo*

---

principal de histocompatibilidade, classe II (MHC-II) e do recetor  $A_{2A}$  da adenosina ( $A_{2A}R$ ) provocado pela betametasona e também o aumento na expressão do fator de necrose tumoral (TNF) provocado por ambos os glucocorticóides sintéticos é mediado por este recetor. Estes resultados levantam a hipótese de as alterações observadas serem mediadas pelo outro recetor corticosteróide, o recetor mineralocorticóide.

Mais estudos de investigação são necessários a fim de perceber as consequências dos efeitos provocados pela dexametasona e pela betametasona na microglia após exposição pré-natal, bem como a sua relação com o aumento da suscetibilidade a doenças psiquiátricas. É relevante também fazer mais estudos de estrutura-atividade entre estes dois diastereoisómeros epímeros a fim de perceber a importância da alteração estereoquímica entre os dois. Uma vez que a maioria das alterações nas células da microglia não são mediadas pelo recetor glucocorticóide, é pertinente identificar os mecanismos pelos quais acontecem estas alterações.

Palavras-chave: microglia, dexametasona, betametasona, recetor glucocorticóide, fenótipo M1 da microglia.

---

**ABSTRACT**



The exposure to synthetic glucocorticoids was described as a risk factor for the genesis of cardiovascular diseases, psychiatric disorders, metabolic disorders and neuroimmune disorders, mediated by the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Pregnant women at risk of preterm delivery are treated with synthetic glucocorticoids to promote the fetal lung maturation, decreasing neonatal mortality. The synthetic glucocorticoids commonly used are dexamethasone and betamethasone, which are epimer diastereomers. Our group previously described that the prenatal exposure to dexamethasone is anxiogenic in Wistar rats, also promoting a morphological remodeling of microglia.

Microglia, immune cells of the central nervous system, possess an essential developmental role concerning their abilities to produce and release cytokines and to prune the developing synapses. The immune system has been associated with psychiatric disorders, as depression, reinforcing the involvement of microglia in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis-induced abnormalities after exposure to synthetic glucocorticoids.

The main objective of this study is to evaluate the physiological roles of microglia in the presence of both drugs, dexamethasone and betamethasone. We also aim to identify the alterations promoted by the effect of these drugs in the glucocorticoid receptor, since both drugs are agonists of this receptor.

To evaluate microglial responses to the short- and long-term exposure to dexamethasone and betamethasone, a microglial cell line, BV-2, was incubated with these drugs for 6 and 24 hours, respectively. In general, both glial reactivity markers and inflammatory markers increased after the incubation, without changing the phagocytic ability. On the other hand, the fractalkine receptor density was affected only after 6 hours of exposure to dexamethasone. Thus, we concluded that microglia is in an activated polarized M1 phenotype, proinflammatory, after exposure to both drugs. However, microglia-neurons communication, through the fractalkine receptor, was only affected by dexamethasone, but the effects of this drug are not only mediated by the glucocorticoid receptor. In fact, only the increased expression of Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA-1), major histocompatibility complex, class II (MHC-II) and adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) was triggered by dexamethasone and the increase in the tumor necrosis factor (TNF) expression triggered by both drugs was mediated by this receptor. This raises the hypothesis of the involvement of the other corticosteroid receptor, the mineralocorticoid receptor.

More studies are necessary to better understand the consequences of the prenatal exposure to dexamethasone and betamethasone on microglia and its association with the increased susceptibility to develop neuropsychiatric disorders. Structure-activity studies

## *Abstract*

---

are necessary to disclose the differences of these drugs regarding their stereochemistry alterations. Since some changes in microglia are not mediated by the glucocorticoid receptor, this is of major importance to identify the action mechanisms of these drugs.

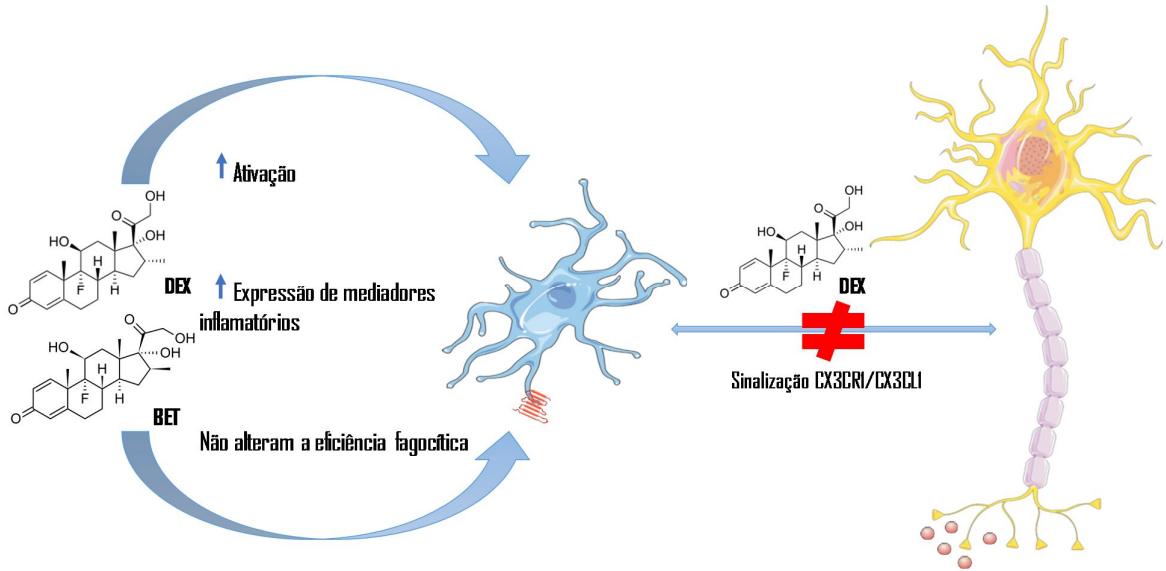
Keywords: microglia, dexamethasone, betamethasone, glucocorticoid receptor, microglial M1 phenotype.

---

**RESUMO GRÁFICO**



Resumo gráfico ilustrando os principais resultados apresentados nesta dissertação: as consequências de uma exposição de curto e longo prazo aos glucocorticóides sintéticos e diastereoisômeros epímeros, dexametasona e betametasona, na microglia. Todas as experiências foram realizadas com a linha celular microglial BV-2.







## **CAPÍTULO 1**

---

### **INTRODUÇÃO**



## 1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, glucocorticóides e homeostase

### 1.1.1. Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal: do *stress* à homeostasia

O organismo humano possui diversos mecanismos de autorregulação. Para controlar o *stress*, o corpo humano dispõe de mecanismos com múltiplos componentes comportamentais e fisiológicos. Estes mecanismos de autorregulação, denominados de processos alostáticos, têm como principal objetivo fazer o sistema retornar de uma situação de *stress* e garantir a sua sobrevivência. Nos mamíferos, a resposta ao *stress* melhor estudada é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA) (Stephens & Wand, 2012).

Os glucocorticóides (GC) (cortisol em humanos e corticosterona em ratos), produto final do eixo HPA, são hormonas esteróides fisiologicamente importantes para manter a homeostase (Waffarn & Davis, 2012). Nos humanos, esta cascata de eventos começa nos neurónios do núcleo paraventricular do hipotálamo com a libertação de duas neurohormonas, a hormona libertadora de corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina (AVP), conectando o hipotálamo e a hipófise. Na hipófise anterior, ambas as hormonas estimulam a produção e a secreção da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) na circulação geral. Uma vez em circulação, a ACTH atinge o rim e estimula a biossíntese e a libertação de cortisol pela zona fasciculada do córtex da glândula suprarrenal (Stephens & Wand, 2012; Waffarn & Davis, 2012; Bellavance & Rivest, 2014). Esta cascata de eventos, que culmina com a libertação de GC, envolve uma complexa interação de múltiplos sistemas centrais e periféricos de resposta ao *stress* (Figura 1) (Waffarn & Davis, 2012).

Para proteger dos efeitos prejudiciais de uma atividade prolongada da cascata, e consequente exposição crónica a níveis elevados de GC, o eixo HPA é cuidadosamente modulado por meio de um circuito de *feedback* negativo. Neste circuito, o cortisol liga-se a recetores na hipófise, hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal, inibindo a resposta do eixo HPA, o que garante a homeostase, uma vez que mantém os níveis hormonais dentro dos limites fisiológicos. Assim, o *feedback* negativo exercido pelo cortisol controla, em parte, a secreção da CRF, AVP e ACTH no hipotálamo e na hipófise (Figura 1) (Stephens & Wand, 2012; Waffarn & Davis, 2012).

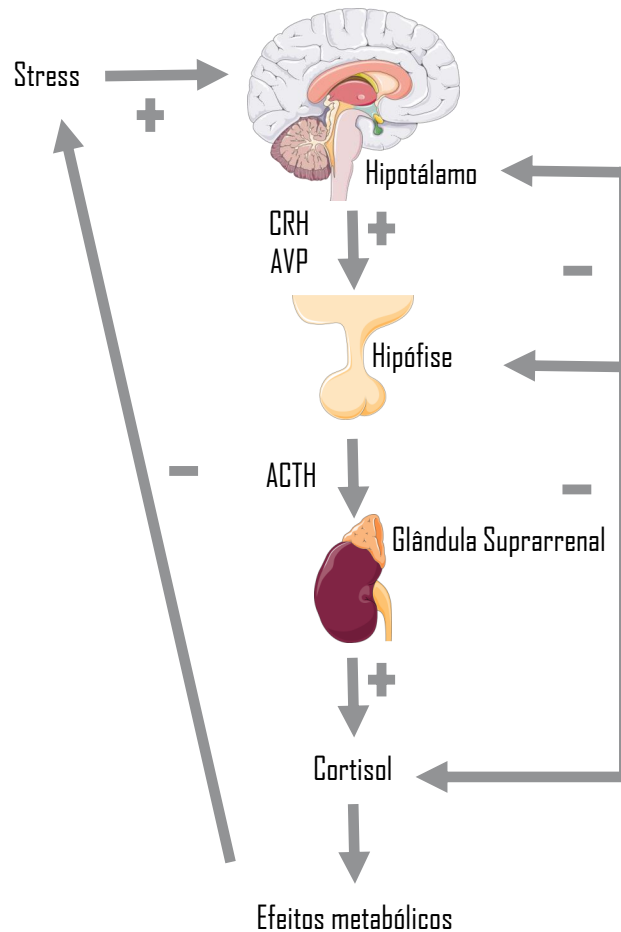


Figura 1| Eixo HPA e mecanismos de *feedback* negativos e positivos do cortisol. Adaptado de (Chivers-Wilson, 2006).

### 1.1.2. Recetores mineralocorticóide e glucocorticóide

Existem dois tipos de recetores de corticosteróides: o recetor mineralocorticóide (RM) (tipo I) e o recetor glucocorticóide (RG) (tipo II). Enquanto a expressão do RM é confinada principalmente às estruturas límbicas, o RG é difusamente distribuído, com níveis mais elevados no sistema límbico, como por exemplo, no hipocampo, no núcleo paraventricular hipotalâmico, no córtex cerebral e na hipófise. O cortisol liga-se com maior afinidade ao RM do que ao RG e, por isso, em concentrações basais, o RM encontra-se ocupado, ao contrário do RG (Matthews *et al*, 2002).

Como referido anteriormente, para manter a homeostase e, conseqüentemente, os níveis hormonais, o eixo HPA é cuidadosamente modulado através da secreção controlada da CRF, AVP e ACTH e através de *feedback* negativo, protegendo assim contra uma possível atividade prolongada. Devido às suas características, os recetores referidos

acima participam neste *feedback* negativo de duas maneiras distintas. Devido às diferenças existentes na afinidade da ligação do cortisol aos recetores, durante o ritmo circadiano normal, o RM ajuda a manter os níveis sanguíneos de cortisol relativamente baixos, enquanto que, durante uma situação de *stress*, em que as concentrações de cortisol aumentam, este liga-se ao RG, resultando na sua ativação e culminando na resposta ao *stress*. Aquando da ativação do RG, este induz um sinal de *feedback* negativo com o intuito de reduzir a atividade do eixo HPA (Stephens & Wand, 2012). Existem vários mecanismos com potencial de regular esta inibição por via de *feedback* negativo: (i) expressão e função do RG; (ii) disponibilidade do cortisol no cérebro, já que a sua entrada pela barreira hematoencefálica (BHE) é limitada por transportadores, como a glicoproteína-P; e (iii) efeitos ambientais, tais como trauma precoce, levando a alterações na função RG diretamente, por mecanismos epigenéticos ou indiretamente, via mecanismos inflamatórios (Pariante & Lightman, 2008).

Esta inibição por feedback é um mecanismo homeostático importante porque a secreção de ACTH e de cortisol deve estar dentro de uma margem de concentrações relativamente estreita, uma vez que a exposição excessiva ou insuficiente ao cortisol pode ter consequências adversas para a saúde e para o bem-estar (Stephens & Wand, 2012).

### **1.1.3. Recetor glucocorticóide e sua sinalização celular**

Depois de se ligarem ao recetor, os corticosteróides produzem o seu principal efeito ao silenciarem múltiplos genes ativados durante os processos inflamatórios. Outros efeitos adicionais dos corticosteróides passam pela síntese de proteínas anti-inflamatórias e também por efeitos pós-genómicos (Barnes, 2006).

Este recetor intracelular só é ativado quando ocorre a sua ligação ao ligando, sendo que, quando não há ligação, o recetor se encontra sequestrado no citosol como um complexo inativo ligado a proteínas, conhecidas como chaperonas moleculares, nomeadamente: proteínas de choque térmico (hsp) 90, hsp70, hsp56, hsp40, uma proteína de baixo peso molecular (p23) e várias imunofilinas (Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006). Estas proteínas ocupam locais no recetor indispensáveis para o transporte para o núcleo, através da membrana nuclear (Wu *et al*, 2004).

Os corticosteróides difundem-se rapidamente através da membrana plasmática por difusão passiva e, no citoplasma, ligam-se ao RG. A difusão passiva é possível, uma vez que estas hormonas são moléculas lipofílicas (Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006). Após a ligação, ocorrem mudanças conformacionais na estrutura do recetor, que

## Introdução

resultam na sua dissociação do complexo proteico, na exposição de locais de sinalização nuclear e na rápida translocação para o núcleo (Necela & Cidlowski, 2004; Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006). No núcleo, o homodímero formado após a dimerização de dois RG acoplados ao ligando pode regular na expressão de genes através de três modos de ação (Necela & Cidlowski, 2004). Dois modos de ação necessitam que o homodímero se ligue diretamente ao ácido desoxirribonucleico (ADN) em sequências específicas na região promotora dos elementos de resposta aos glucocorticóides, podendo estimular a expressão genética (transativação) se estes se ligarem a elementos de resposta aos glucocorticóides (GRE), ou pode inibir a expressão genética (transrepressão), se se ligar a elementos negativos da resposta aos glucocorticóides (nGRE) (Necela & Cidlowski, 2004; Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006; Moraitis *et al*, 2017). Também é possível que a regulação ocorra por meio de interações físicas entre o homodímero e fatores de transcrição e interações proteína-proteína (mecanismo independente da ligação direta a um GRE) (Figura 2) (Necela & Cidlowski, 2004).

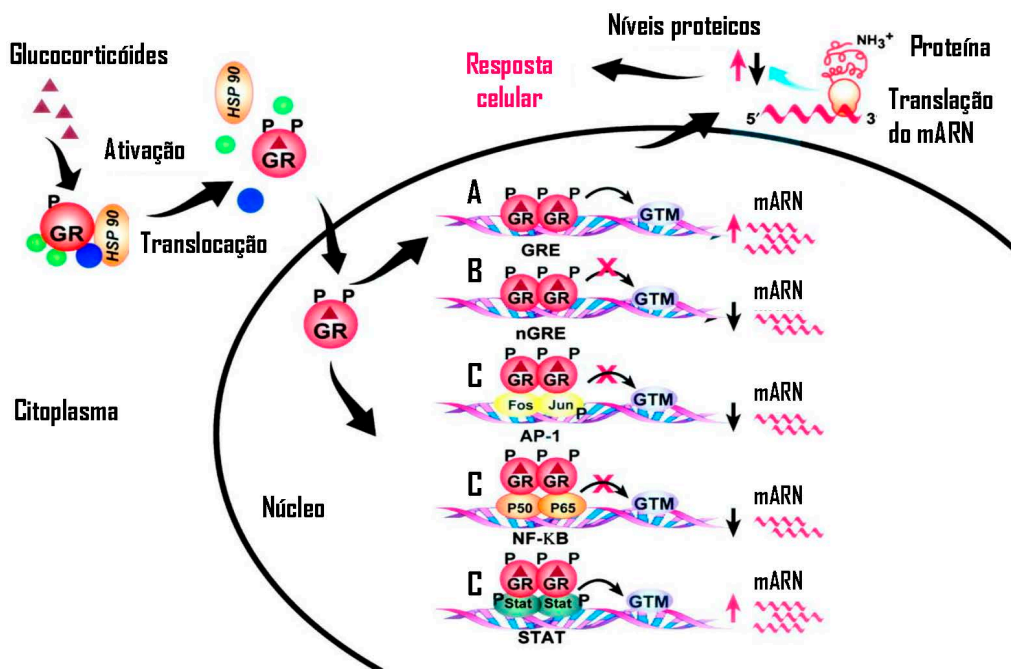


Figura 2| Representação dos mecanismos básicos de ação do RG. Já no núcleo, o RG regula a expressão de genes através de três vias diferentes: A- RG liga-se aos GRE; B- RG liga-se aos nGRE; C- interação física entre o homodímero e fatores de transcrição ou interações entre proteína-proteína. Adaptado de (Necela & Cidlowski, 2004).

#### 1.1.4. O antagonista do recetor glucocorticóide

A mifepristona (MIF), também conhecida como RU-486 (Figura 3), é um esteróide sintético com atividade anti-GC; trata-se de um antagonista não seletivo do RG (Clark, 2008) e que se liga a este com uma afinidade três a quatro vezes maior que agonistas sintéticos do recetor (Carmichael & Fleseriu, 2013). Este composto foi descoberto pela empresa farmacêutica francesa Roussel-Uclaf no início de 1980 (Gallagher & Young, 2006).

A sua atividade anti-GC permite reduzir a produção excessiva de cortisol através do bloqueio da ação deste ao nível do seu recetor (Carmichael & Fleseriu, 2013). O mecanismo subjacente ao bloqueio da ação dos GC passa pela ligação da MIF ao recetor; no entanto, esta ligação não permite que o recetor assuma a conformação necessária para se poder ligar aos seus alvos, no núcleo (Clark, 2008; Carmichael & Fleseriu, 2013). Esta conformação é reversível (Carmichael & Fleseriu, 2013).

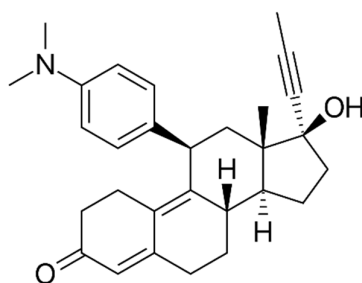


Figura 3| Representação da molécula de MIF.

#### 1.1.5. Desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal: impacto no desenvolvimento

Na década de 1950, com o início das investigações de Levine e colaboradores, foi descoberto que o ambiente intrauterino tem o potencial de exercer efeitos duradouros sobre o funcionamento do eixo HPA (Levine, 1957). A gravidez, com exposição a GC exógenos, influencia diretamente o desenvolvimento do eixo HPA fetal, com consequências a longo prazo (Waffarn & Davis, 2012). Estes efeitos no desenvolvimento após administração pré-natal de GC sintéticos são plausíveis de ser mediados pelo RG, uma vez que estes fármacos se ligam predominantemente a este recetor (Matthews *et al*, 2002).



Dependendo do momento da exposição, o impacto da exposição ao GC sintéticos no cérebro depende da expressão dos RG E RM (Matthews *et al*, 2002). Em fetos humanos, os RG foram já identificados às seis semanas de gestação em múltiplos tecidos (Condon *et al*, 1998).

As alterações no eixo HPA fetal, após exposição a GC exógenos, deve-se ao facto de os análogos sintéticos dos GC atravessarem a BHE (Myers *et al*, 2014).

### **1.2. Glucocorticóides sintéticos**

Esta classe de fármacos, os GC, tem um amplo espectro de ação porque modulam variados processos biológicos: regulam as funções cardiovascular, neurobiológica e imunológica e influenciam o metabolismo de lípidos, proteínas, e hidratos de carbono, com o objetivo de manter a homeostase e mediar a adaptação a situações de *stress* (Sapolsky, 2000). Devido ao importante papel dos GC endógenos na regulação da maioria dos sistemas biológicos, os seus análogos sintéticos são amplamente usados na prática clínica para uma grande variedade de condições clínicas (Tegethoff *et al*, 2009).

Durante o desenvolvimento, os GC sintéticos são maioritariamente administrados a mulheres grávidas em risco de parto prematuro, a fim de aumentar as trocas gasosas e a maturação fetal pulmonar devido ao desenvolvimento morfológico acelerado de pneumócitos tipo 1 e 2 (Noorlander *et al*, 2014; Haram *et al*, 2017). Entre as complicações graves associadas ao parto prematuro estão morbilidades como a síndrome do desconforto respiratório (SDR), consequência do desenvolvimento pulmonar imaturo, sendo a principal causa de morte neonatal prematura e contribuindo significativamente para os riscos de incapacidades neurológicas e para os altos custos dos cuidados intensivos neonatais (Haram *et al*, 2017; França *et al*, 2016). Por estas razões, a corticoterapia pré-natal é usada para reduzir as complicações relacionadas com a prematuridade e é prescrita a mulheres em risco de parto prematuro (Peffer *et al*, 2015). O nascimento prematuro, ou nascimento com menos de 37 semanas completas de gestação, é um fator determinante para o desenvolvimento de morbilidades e para mortalidade pós-natal e a longo prazo (Saigal & Doyle, 2008).

Estes fármacos também podem ser usados durante a gravidez para inúmeras outras condições da mãe e do bebé, nomeadamente alergias (Tegethoff *et al*, 2009).

### 1.2.1. Uma visão geral

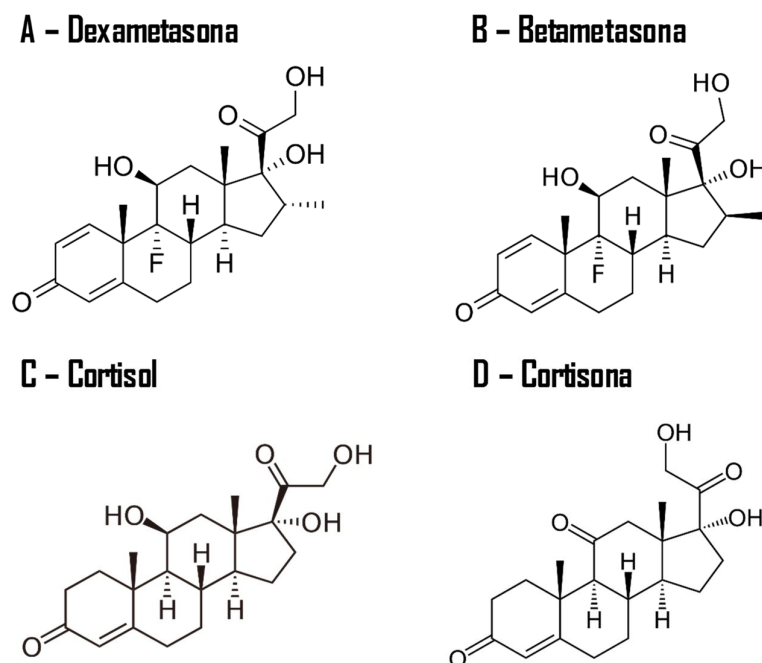
No final de 1960, a terapêutica com GC foi testada em fetos de ovelha pela primeira vez. No entanto, só se tornou parte da prática clínica depois de 1972, quando Liggins e Howie, após realizarem o primeiro ensaio clínico randomizado com betametasona (BET) em humanos para a prevenção da SDR, propuseram a introdução dos corticosteróides pré-natais a fim de acelerar a maturação fetal pulmonar na clínica (Liggins, 1969; Liggins & Howie, 1972). Como referido anteriormente, a prevenção da SDR e, conseqüentemente, a maturação pulmonar fetal é fundamental antes do nascimento, pois esta doença pulmonar é uma complicação grave do trabalho de parto prematuro e a principal causa de morte neonatal precoce (Jobe & Soll, 2004; Roberts, Sr, Roberts, & Dalziel, 2013). Com os GC sintéticos, a mortalidade neonatal e morbidade em prematuros nascidos antes das 34 semanas de gestação demonstrou reduções significativas (Waffarn & Davis, 2012).

Em 1994, o *Consensus Developmental Conference* do Instituto nacional de Saúde Americana (NIH) sobre os resultados perinatais dos efeitos dos corticosteróides na maturação fetal, determinou que seriam candidatos à corticoterapia pré-natal todos os fetos em risco de parto prematuro, entre as 24 e as 34 semanas de gravidez (Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes, 1994).

Historicamente, apenas dois compostos pertencentes à classe dos GC sintéticos têm sido usados para administração pré-natal: a dexametasona (DEX) e a BET (Peffer *et al*, 2015).

### 1.2.2. Dexametasona e Betametasona

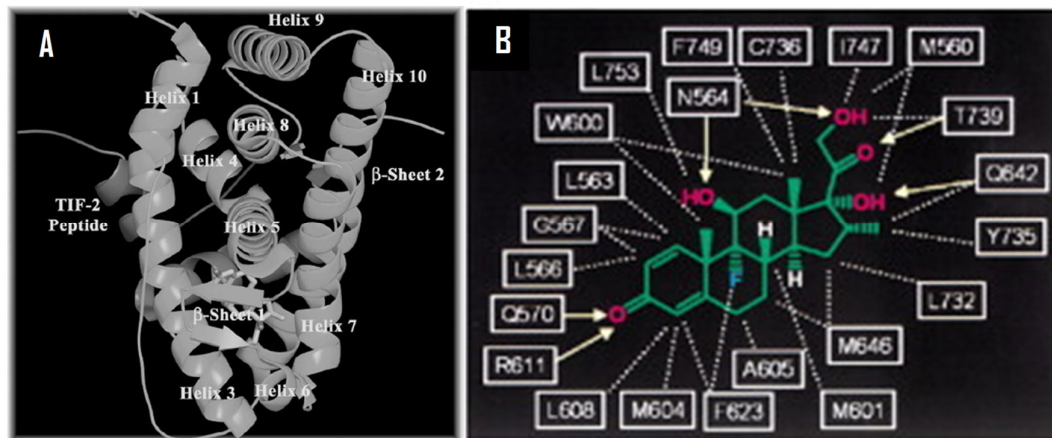
A DEX e a BET têm uma estrutura semelhante, já que estas moléculas são diastereoisómeros epímeros, que variam apenas na orientação do grupo 16-metil: a DEX tem este grupo em orientação  $\alpha$ , enquanto que a BET tem o mesmo grupo em orientação  $\beta$  (Figura 4, A e B). Por este motivo têm a mesma fórmula molecular,  $C_{22}H_{29}FO_5$ , e massa molecular, 392,46 g/mol (Li, 2012; Peffer *et al*, 2015). Em termos de estrutura química, comparando os equivalentes endógenos cortisol e corticosterona com a DEX e a BET, pode referir-se que estas últimas possuem uma ligação dupla, um átomo 9-fluor e um grupo 16-metil a mais, sendo que este grupo 16-metil é responsável pela diferença entre os dois análogos exógenos (Figura 4) (Diederich *et al*, 2002).



**Figura 4| A - Representação da molécula de DEX; B - Representação da molécula de BET; C - Representação da molécula de cortisol; D - Representação da molécula de cortisona. A DEX e a BET possuem uma ligação dupla adicional nos primeiros anéis e nos grupos 9-fluor e 16-metil, quando comparados com o cortisol.**

Estes fármacos sintéticos, agonistas do RG, possuem uma atividade reduzida no RM, contrastando com uma maior afinidade para o RG (Grossmann *et al*, 2004). Vários estudos indicam que estes GC sintéticos se ligam com uma afinidade vinte e cinco vezes maior do que o cortisol ao RG (Tegethoff *et al*, 2009).

Ligam-se ao RG na região referida como domínio de ligação do ligando (LBD) (Figura 5, A). Esta região está situada na extremidade do terminal C do recetor, entre os aminoácidos 521 e 777 (Bledsoe *et al*, 2004). O grupo 16-metil, a única diferença estereoquímica entre a DEX e a BET, está implicado na ligação ao recetor, uma vez que este grupo estabelece interações hidrofóbicas com o aminoácido glutamina 643 e o aminoácido tirosina 735, no caso da DEX (Figura 5, B) (Bledsoe *et al*, 2002).



**Figura 5| A - Perspetiva lateral da estrutura cristalina de RG LBD no complexo com DEX; B - Interações entre a DEX e o RG (representação esquemática).** Adaptado de A - (Bledsoe *et al*, 2004) e B - (Bledsoe *et al*, 2002).

Enquanto a DEX é administrada às gestantes em risco de parto prematuro como fosfato de DEX (Jobe *et al*, 2009), a BET é administrada como uma combinação de fosfato de sódio de BET e acetato de BET (Falah & Haas, 2014). Devido à preparação química específica, os fármacos variam entre si nas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Tegethoff *et al*, 2009) e, por isso, têm uma farmacocinética complexa (Haram *et al*, 2017), embora a farmacocinética da BET seja mais complexa devido à mistura de dois sais de biodisponibilidades diferentes (Falah & Haas, 2014).

Os fosfatos de DEX e BET são rapidamente absorvidos e desfosforilados, enquanto que o acetato de BET é absorvido e desacetilado mais lentamente, provocando um efeito prolongado. A BET apresenta um tempo de meia-vida mais elevado do que a DEX, entre 6,5 e 9 horas e entre 4 e 4,6 horas, respetivamente (Samtani, 2005; Tegethoff *et al*, 2009; Haram *et al*, 2017)

São também administrados em doses e intervalos posológicos diferentes. A DEX é administrada por via intramuscular materna, sendo administrados 6 mg em intervalos de 12 horas, num total de 4 administrações e a BET, igualmente administrada por via intramuscular materna numa dose de 12 mg em intervalos de 24 horas, num total de duas doses (Lee *et al*, 2006). Estas doses e intervalos de tempo amplamente utilizados foram determinados empiricamente e recomendados na conferência do NIH em 1994 (Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes, 1994).

Todas estas variações resultam em farmacocinéticas diferentes e talvez levem a alterações na duração e concentração de GC à qual o feto é exposto. Isto é clinicamente pertinente porque a farmacocinética e a farmacodinâmica determinam a exposição do

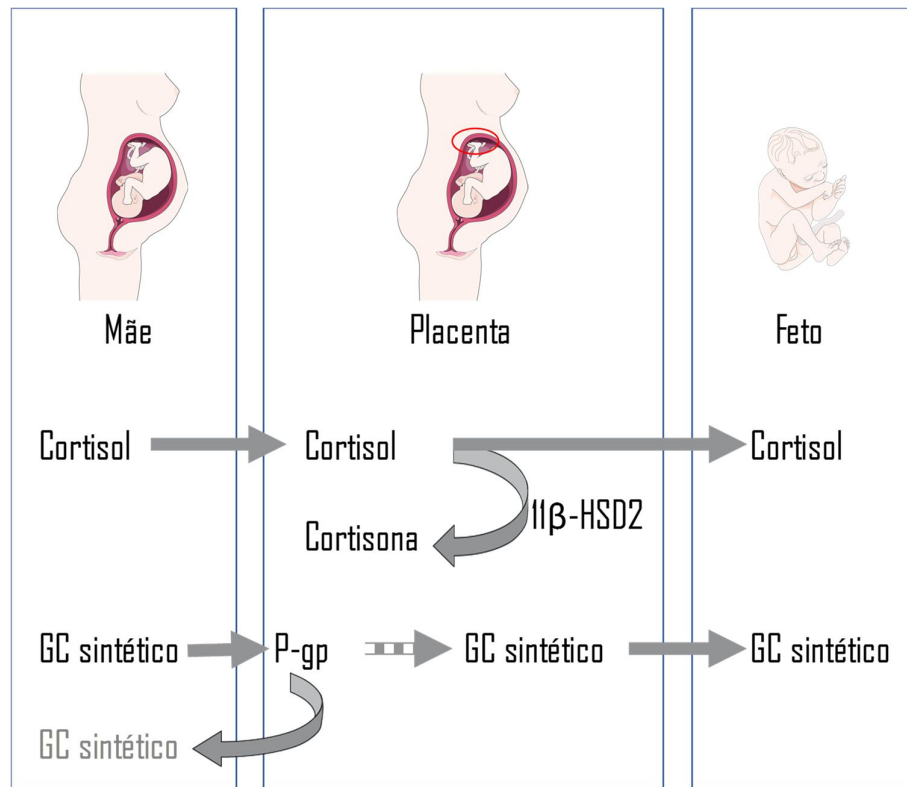
feto. Em mulheres grávidas, estes processos regulam a ligação às proteínas e a extensão da absorção dos fármacos, a sua distribuição através dos fluídos e dos tecidos, o seu metabolismo e a sua eliminação, enquanto que, na unidade feto-placentária, regulam a quantidade de fármaco que atravessa a placenta, o seu metabolismo, a sua distribuição e a sua eliminação (Tegethoff *et al*, 2009).

Estudos em animais e em humanos sugerem que a saúde e o desenvolvimento podem ser afetados na descendência devido à exposição intrauterina a estes agonistas dos GC, causando preocupações sobre a segurança desta terapia (Tegethoff *et al*, 2009).

### **1.2.3. Glucocorticóides sintéticos na placenta**

Os GC sintéticos atravessam a placenta e chegam ao cérebro fetal onde, por mecanismos de *feedback*, regulam negativamente o eixo HPA fetal e têm um efeito direto na neurogénese, sinaptogénese e mielinização (McCabe *et al*, 2001).

De facto, o cortisol e a corticosterona, corticosteróides endógenos não são transferidos da circulação materna para a circulação fetal, devido à existência da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD) (Chapman *et al*, 2013). Esta desidrogenase tem duas isoformas diferentes: 11 $\beta$ -HSD-1 e 11 $\beta$ -HSD-2. No organismo humano, estas têm distribuições e funções distintas. A 11 $\beta$ -HSD-1 é amplamente expressa em tecidos metabólicos-chave como o fígado, tecido adiposo e sistema nervoso central (SNC); já a expressão da 11 $\beta$ -HSD-2 é altamente específica em tecidos como a placenta, o rim e o pulmão. Em termos de funções, a primeira possui atividade de desidrogenase (conversão de cortisol a cortisona) e redutase (conversão de cortisona a cortisol) enquanto que a segunda possui apenas atividade de desidrogenase. Esta última possui uma maior afinidade para os GC e, na placenta, converte o cortisol materno em cortisona inativa, criando um gradiente efetivo entre mãe e filho (Figura 6) (Moisiadis & Matthews, 2014).



**Figura 6| Barreiras placentárias aos GC endógenos e sintéticos durante a gravidez.**  
Adaptado de (Moisiadis & Matthews, 2014).

No entanto, durante a fase final da gravidez, em muitas espécies, os níveis placentários de 11β-HSD-2 diminuem e permitem um aumento da transferência de GC ativos entre as partes (Challis *et al*, 2000).

A isoforma placentária tem baixa afinidade pelos GC sintéticos e, por isso, não cria uma barreira efetiva entre mãe e feto (Figura 6). No entanto, evidências na literatura indicam que a transferência de GC sintéticos da mãe para o feto pode diminuir devido ao envolvimento placentário (Sun *et al*, 2006; Iqbal *et al*, 2012). Este mecanismo envolve um membro da família de transportadores ABC, a glicoproteína P, expressa em altos níveis na camada de sincitiotrofoblastos da placenta de mamíferos (Sun *et al*, 2006; Iqbal *et al*, 2012). A glicoproteína-P é responsável pelo transporte de substratos específicos, tais como produtos xenobióticos, medicamentos e certas hormonas, para além de ser um transportador particularmente efetivo de GC sintéticos (Yates *et al*, 2003). No entanto, no último período da gestação, os níveis placentários da glicoproteína P diminuem (Sun *et al*, 2006; Iqbal *et al*, 2011). Estas alterações durante a gestação nos níveis placentários de 11β-HSD-2 e de glicoproteína P terão efeitos significativos nas concentrações de GC endógenos e sintéticos que são transferidos da mãe para o feto e, por isso, em diferentes períodos da gestação, os GC endógenos e sintéticos sofrem uma modulação placentária

que pode ter efeitos diferentes no feto. Além disso, os GC influenciam indiretamente o desenvolvimento fetal, uma vez que podem exibir ações diretas sobre a função placentária. Na placenta humana, tanto os GC sintéticos quanto os GC endógenos aumentam a produção e a libertação de CRH na placenta, o que pode ativar o eixo HPA fetal e materno (Torricelli *et al*, 2011).

### **1.3. Microglia**

#### **1.3.1. Descoberta da microglia**

Em 1956, Virchow descreveu pela primeira vez a neuroglia como uma entidade distinta dos elementos neuronais, com propriedades adesivas e de conexão entre os neurónios (revisão por: Tremblay *et al*, 2015). Trinta e nove anos depois, em 1895, Lenhossek introduziu o termo “astrócito” para designar o elemento celular da neuroglia (revisão por: Sierra *et al*, 2016).

Dois anos depois, foi publicado o primeiro trabalho inteiramente dedicado à neuroglia por Ramón y Cajal. Neste trabalho, o cientista especula que este tipo de células pode preservar circuitos neuronais e evitar contactos inapropriados e, também neste trabalho, reconhece mais tipos de células, além dos neurónios e dos astrócitos (revisão por: Tremblay *et al*, 2015). No ano seguinte, Nissl descobriu um tipo de células conhecido como células bastonetes, atribuindo-lhes a natureza de neuroglia. Nissl também sugere que estas células adotam funções similares aos macrófagos no cérebro e hipotetiza a capacidade de fagocitarem neurónios “danificados” (revisão por: Tremblay *et al*, 2015). Em 1913, Ramon y Cajal identificou o “terceiro elemento” do SNC, distinto do “primeiro elemento” (neurónios) e do “segundo elemento” (astrócitos). Esta classe de células gliais tinha uma origem mesodérmica e era uma célula dendrítica e apolar da matéria branca, com localização perineuronal e perivascular (revisão por: Tremblay *et al*, 2015).

Pela primeira vez, em 1919, a microglia foi visualizada e identificada por Pío Del Río-Hortega. Esta clara identificação foi possível devido à introdução e desenvolvimento de novas técnicas de coloração, como o método de carbonato de prata amoniacal. Com esta descoberta, Río-Hortega foi capaz de distinguir o “terceiro elemento” em dois tipos de células individuais: a microglia e a glia interfascicular (mais tarde denominado de oligodendrócitos) (revisões por: Tremblay *et al*, 2015; Sierra *et al*, 2016).

### 1.3.2. Origem e desenvolvimento da microglia

A origem da microglia tem sido um assunto em debate; no entanto, hoje em dia, já se sabe que a microglia é originária de um conjunto de macrófagos primitivos de hematopoiese, no saco vitelino (Reemst *et al*, 2016; Wolf *et al*, 2017). Estas células imunes são encontradas no cérebro de ratos em desenvolvimento no dia embrionário 8,5. Já em humanos, células semelhantes à microglia são detetadas na 13<sup>a</sup> semana de gestação, enquanto a microglia ramificada é detetada na 21<sup>a</sup> semana (Wolf *et al*, 2017). Esta microglia embrionária permanece em grande maioria na idade adulta (Reemst *et al*, 2016).

No cérebro de ratos adultos, a densidade da microglia varia entre 5% e 12%, com um maior número de células microgliais na substância cinzenta (Mittelbronn *et al*, 2001). As áreas mais povoadas são o hipocampo, o telencéfalo olfatório, os núcleos da base e a substância nigra, enquanto que as áreas menos povoadas são o cerebelo, as fibras nervosas e grande parte do tronco cerebral; por sua vez, o córtex cerebral, o tálamo e o hipotálamo possuem densidades celulares médias (Lawson *et al*, 1990).







### 1.3.3. Diferentes fenótipos de microglia durante a vida

Desde que surge no cérebro, no feto, até ao adulto, a microglia apresenta diferentes morfologias. No hipocampo pré- e pós-natal de ratos existem dois tipos principais de células microgliais: as células microgliais amebóides, caracterizadas por uma notável diversidade de formas e tamanhos e sem processos definidos e a microglia ramificada, caracterizada por um número flexível de processos celulares de diversos comprimentos e espessuras (Dalmau *et al*, 1998).

Durante o desenvolvimento pré-natal do rato, a microglia pode assumir quatro subtipos distintos no hipocampo: microglia amebóide tipos 1, 2 e 3 e microglia ramificada primitiva (Dalmau *et al*, 1997). No hipocampo do rato pós-natal, é possível encontrar cinco subtipos diferentes de células microgliais: microglia amebóide tipos 2 e 3, microglia ramificada primitiva, microglia em repouso e microglia do tipo reativo (Dalmau *et al*, 1998). As principais características morfológicas dos diferentes subtipos de células da microglia estão resumidas na Tabela 1.



**Tabela 1| Características dos diferentes subtipos de células da microglia presentes no hipocampo de ratos ao longo da vida [DE (dia embrionário); DPN (dia pós-natal)]. Adaptado de (Dalmau *et al*, 1997, 1998).**

<b>Tipo de célula</b>	<b>Forma</b>	<b>Processos celulares</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Existência no cérebro</b>	<b>Morfologia celular</b>
<b>Microglia amebóide tipo 1</b>	Arredondada e por vezes lobular	Nenhum	15-40 µm	Desde DE14	
<b>Microglia amebóide tipo 2</b>	Redonda	Nenhum, ocasionalmente filopodia	15-20 µm	Desde DE19 até DPN9, raramente a DPN12	
<b>Microglia amebóide tipo 3</b>	Pleomórfica	Filopodia e/ou Pseudopódia	15-50 µm	Desde DE14 até DPN9, alguns a DPN15	
<b>Microglia primitiva ramificada</b>	Oval a ligeiramente alongada	Processos escassamente desenvolvidos, mostrando uma forma frisada	50-75/85 µm	Desde DE19 até DPN12, alguns a DPN15 e raramente a DPN18	
<b>Microglia em "repouso"</b>	Oval a arredondada	Processos totalmente desenvolvidos	85-100 µm	Alguns a DPN12, DPN15 até DPN18	
<b>Microglia do tipo reativo</b>	Grande e condensada, desde redonda a oval	Processos atrofiados e retraídos	40/50-80 µm	Principalmente desde DPN9 até DPN18	

### **1.3.4. A microglia e as suas funções no sistema nervoso central**

Desde a sua descoberta, as células da microglia foram reconhecidas apenas pelo seu envolvimento na reparação tecidual (libertação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias) em condições patológicas, tendo-se desprezado os seus papéis fisiológicos. No entanto, em 2005, com a publicação de dois artigos, este paradigma foi alterado. Nimmerjahn e colaboradores, e também Davalos e colaboradores demonstraram o papel da microglia no cérebro saudável. Observaram que os processos da microglia são dinâmicos e vigilantes durante o estado de "repouso", mas durante uma lesão traumática, respondem, dirigindo-se para o local (Nimmerjahn *et al*, 2005; Davalos *et al*, 2005).

No cérebro, a microglia é amplamente distribuída, exercendo uma série de funções com dois objetivos principais: defesa imunológica e manutenção do SNC (Ginhoux *et al*, 2013).

No sistema imunitário, a microglia exerce geralmente uma resposta secundária, alterando a sua morfologia e o seu padrão de expressão de citocinas, a fim de responder a uma ameaça inicial. Este processo pode ser denominado por “ativação” (Miyamoto *et al*, 2013). No SNC a “microglia ativada” é heterogénea e caracterizada em dois tipos diferentes: o fenótipo M1 e o fenótipo M2 (Tang & Le, 2016). Dependendo do estímulo pelo qual é ativada, a microglia M1 é caracterizada por um estado de ativação clássico, enquanto a microglia M2 é caracterizada por um estado de ativação alternativo ou por um estado de ativação adquirido. A microglia M2 liberta vários compostos anti-inflamatórios e antagoniza as respostas pró-inflamatórias M1 (Tang & Le, 2016).

Ao supervisionar o microambiente no SNC, a microglia é responsável pela fagocitose de células mortas e sinapses, um processo crítico para uma conectividade sináptica precisa; pela promoção da sobrevivência, proliferação e/ou diferenciação celular e, também, pela regulação da maturação, plasticidade e função das sinapses no cérebro saudável (Schafer & Stevens, 2015). Estas funções podem ser implicadas na regulação do comportamento, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos como o autismo, transtorno obsessivo-compulsivo e esquizofrenia, já que existe ativação da microglia e alteração da conectividade sináptica nestes doentes (Schafer & Stevens, 2015). Modelos animais destas doenças neuropsiquiátricas também evidenciam o papel da microglia no desenvolvimento e/ou progressão de fenótipos comportamentais (Schafer & Stevens, 2015).

### **1.3.5. Microglia e Neurónios**

Os circuitos neuronais podem ser influenciados pela microglia porque, como já referido, estas células imunes têm a capacidade de formar e eliminar sinapses graças à sua capacidade de secretar vários fatores com propriedades transmissoras, tróficas ou neuroprotetoras e da sua capacidade de fagocitar elementos subcelulares (Figura 7) (Kettenmann *et al*, 2013).

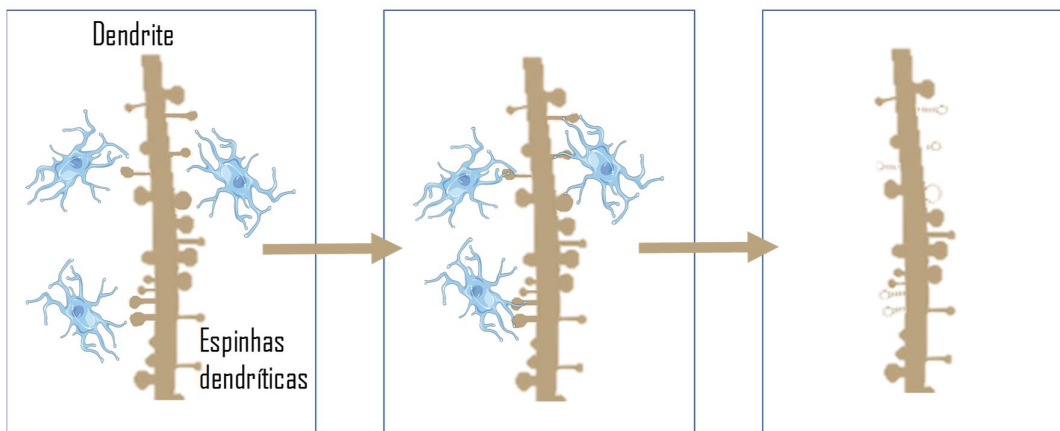
Lim e colaboradores demonstraram que a microglia induz a formação de sinapses em neurónios do hipocampo através da libertação da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10) (Lim *et al*, 2013). A libertação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também promove a formação de sinapses relacionadas com a aprendizagem (Parkhurst

## Introdução

*et al*, 2013). Um estudo do nosso grupo demonstra também a capacidade da microglia ativada em promover a formação de sinapses em neurónios hipocampais (Cristovão *et al*, 2014).

Como referido acima, uma das funções da microglia no cérebro é a fagocitose. Esta capacidade das células microgliais permite eliminar células inteiras ou subestruturas celulares, nomeadamente conexões inapropriadas de sinapses e axónios (Figura 7) (Reemst *et al*, 2016; Wolf *et al*, 2017). Durante o neurodesenvolvimento, esta função também denominada de *pruning* sináptico é fundamental para estabelecer e refinar os circuitos neuronais (Miyamoto *et al*, 2013). Estudos na literatura relatam que um *pruning* sináptico deficiente resulta em sinapses imaturas através de um aumento de espinhas dendríticas, sendo este aumento característico de um circuito cerebral imaturo (Paolicelli *et al*, 2011).

Um mecanismo capaz de eliminar o excesso de conexões sinápticas envolve as proteínas do sistema do complemento, C3, e o recetor do complemento 3 (CR3); mais especificamente: o recetor expresso na superfície da microglia interage com a C3 presente nos compartimentos sinápticos, mediando o *pruning* de elementos sinápticos (Stephan *et al*, 2012).



**Figura 7| Ilustração do *pruning* sináptico nas dendrites dos neurónios por células microgliais. Durante o *pruning* sináptico, a microglia digere as espinhas dendríticas, diminuindo assim o seu número. Adaptado de (Miyamoto *et al*, 2013).**

### 1.3.6. Sinalização recetor da fratalquina/fratalquina

Existe um tipo de comunicação/sinalização entre a microglia e os neurónios altamente específica, uma vez que o recetor de sinalização é expresso unicamente na microglia,

enquanto o ligando é expresso unicamente pelos neurónios (Wolf *et al*, 2013; Paolicelli *et al*, 2014).

A frataquina, também denominada de CX3CL1 e o seu recetor CX3CR1, têm papéis importantes no desenvolvimento cerebral normal. A sua interação promove o recrutamento microglial para junto dos neurónios, com o objetivo de desempenhar um papel crítico na regulação de um amplo espectro de propriedades que visam essencialmente promover a regulação da neurogénese, da transmissão e da plasticidade sináptica, da maturação e eliminação de sinapses e também, na regulação do desenvolvimento e da plasticidade dos neurónios (Paolicelli *et al*, 2014).

Deficiências na comunicação entre a microglia e os neurónios diminuem a migração e a motilidade da microglia (Liang *et al*, 2009) e resultam também numa microglia hiperativada, que pode ser prejudicial ou benéfica ao ambiente, dependendo da situação específica (Wolf *et al*, 2013). Podem também ocorrer alterações na conectividade e plasticidade cerebral correlacionadas com défices de interação social, na ausência desta via (Paolicelli *et al*, 2011, 2014; Zhan *et al*, 2014).

#### **1.4. Origem de doenças neuropsiquiátricas no desenvolvimento: a função do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, do recetor glucocorticóide e da microglia**

Os efeitos dos GC sintéticos mediados pelo RG, no momento da exposição, são dependentes do estado de maturação e da expressão do RG no eixo HPA fetal e das regiões envolvidas nesta regulação, como é o caso do hipocampo (de Kloet *et al*, 1998; Herman *et al*, 2005; Tegethoff *et al*, 2009). O RG está presente no cérebro fetal desde cedo (Condon *et al*, 1998), o que sugere que a função do eixo HPA fetal e infantil pode ser aguda ou cronicamente comprometida (Bertram, 2002).

O estudo dos efeitos da exposição a análogos exógenos no eixo HPA fetal e infantil é muito importante, pois o ambiente intrauterino e os sistemas de órgãos fetais são altamente sensíveis a alterações estruturais e funcionais. Estas mudanças podem persistir ao longo da vida, influenciando o desenvolvimento e a saúde (Seckl & Meaney, 2004).

Nos animais, já é conhecido que o eixo HPA é suscetível a alterações ocorridas no ambiente intrauterino, e que os GC desempenham um papel crucial (Phillips, 2007; Tegethoff *et al*, 2009). Em humanos, estes estudos podem ser clinicamente relevantes,

## Introdução

---

uma vez que os GC sintéticos são geralmente usados em medicina neonatal e a disfunção da atividade do eixo HPA tem sido correlacionada com vários efeitos adversos na saúde (Charmandari *et al*, 2003). Estudos epidemiológicos e estudos com animais demonstram que, exposições pré-natais a altas concentrações de GC mediadas pelo eixo HPA, aumentam o risco de doenças cardiovasculares, de doenças psiquiátricas, de distúrbios metabólicos e de disfunções neuroendócrinas durante a vida (Seckl & Meaney, 2004; Cottrell & Seckl, 2009; Harris & Seckl, 2011) .

Em humanos, uma revisão científica sobre os efeitos psiquiátricos dos corticosteróides pediátricos reporta que exposições pré- e neonatais a DEX levam ao aumento de disfunções neuropsiquiátricas (Drozdowicz & Bostwick, 2014). A mesma revisão levanta a hipótese de a BET ser uma melhor opção terapêutica (Drozdowicz & Bostwick, 2014). De facto, ensaios clínicos demonstram que o uso de BET em grávidas em risco de parto prematuro apresenta efeitos secundários menos graves e menos recorrentes do que o uso de DEX, diminuindo o atraso no desenvolvimento, problemas de audição e o risco de morte neonatal aquando do uso de DEX (Rayburn *et al*, 1997; Lee *et al*, 2006, 2008). Em animais, a administração de DEX já foi correlacionada com suscetibilidade ao comportamento do tipo ansioso. Oliveira e colaboradores demonstraram que a exposição intrauterina à DEX desencadeia um fenótipo híper-ansioso em ratos adultos (Oliveira *et al*, 2006, 2012). Este fenótipo híper-ansioso pode predispor ao desenvolvimento de depressão, sendo que, o comprometimento do *feedback* do eixo HPA pelos GC também já foi correlacionado com distúrbios da ansiedade (Reul, 2002; Ströhle & Holsboer, 2003).

Evidências na literatura correlacionam a desregulação do sistema imune com o desenvolvimento da depressão (Ślusarczyk *et al*, 2015). Várias hipóteses, nomeadamente alterações no eixo HPA e no sistema imunológico, têm sido apontadas como explicação da correlação entre vias neurobiológicas e adversidades infantis que levam ao desenvolvimento de doenças mentais em adultos (Calcia *et al*, 2016). De facto, o sistema imune da descendência encontra-se alterado e é influenciado após *stress* pré-natal materno (O'Connor *et al*, 2013). A microglia, células imunes do SNC, pode ter um papel relevante neste processo.

O RG é expresso nas células da microglia (Tanaka *et al*, 1997). A sua presença pode afetar o desenvolvimento normal da microglia, implicando estas células nos efeitos dos GC no cérebro (Sierra *et al*, 2008; Caetano *et al*, 2017). Por outro lado, os GC podem induzir a modulação da microglia, alterando o padrão normal de libertação de citocinas (Frank *et al*, 2010).

As células microgлияis e também as doenças psiquiátricas podem estar correlacionadas com a disfunção da atividade do eixo HPA na vida intrauterina.

De facto, a DEX influencia a diferenciação morfológica da microglia na descendência em função do género. Quando ratas grávidas são expostas a este fármaco, ocorre esta diferenciação na descendência e que é correlacionada com modulações no comportamento, uma vez que estes animais apresentam um comportamento do tipo ansioso quando avaliados no labirinto em cruz elevado (Caetano *et al*, 2017). Outros estudos em animais, usando um modelo fisiológico de *stress* pré-natal, demonstraram ativação das células da microglia, aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios, de quimiocinas e dos respetivos recetores, na descendência (Diz-Chaves *et al*, 2012, 2013; Ślusarczyk *et al*, 2015).

A regulação do eixo HPA e os GC estão envolvidos em vários transtornos psiquiátricos, dos quais fazem parte a depressão. Por outro lado, evidências na literatura realçam o papel da microglia na fisiopatologia e no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos (Kato *et al*, 2013b), nomeadamente esquizofrenia (Monji *et al*, 2009; Kato *et al*, 2011; Monji *et al*, 2013). Por sua vez, os GC e a CRH também modulam as células da microglia no SNC, ativando a libertação de fatores pró-inflamatórios por este tipo de células, os quais podem resultar em sintomas de ansiedade e depressão. Estas evidências sugerem uma forte ligação entre os distúrbios psiquiátricos, os GC, o eixo HPA e as células da microglia (Figura 8) (Kato *et al*, 2013a).

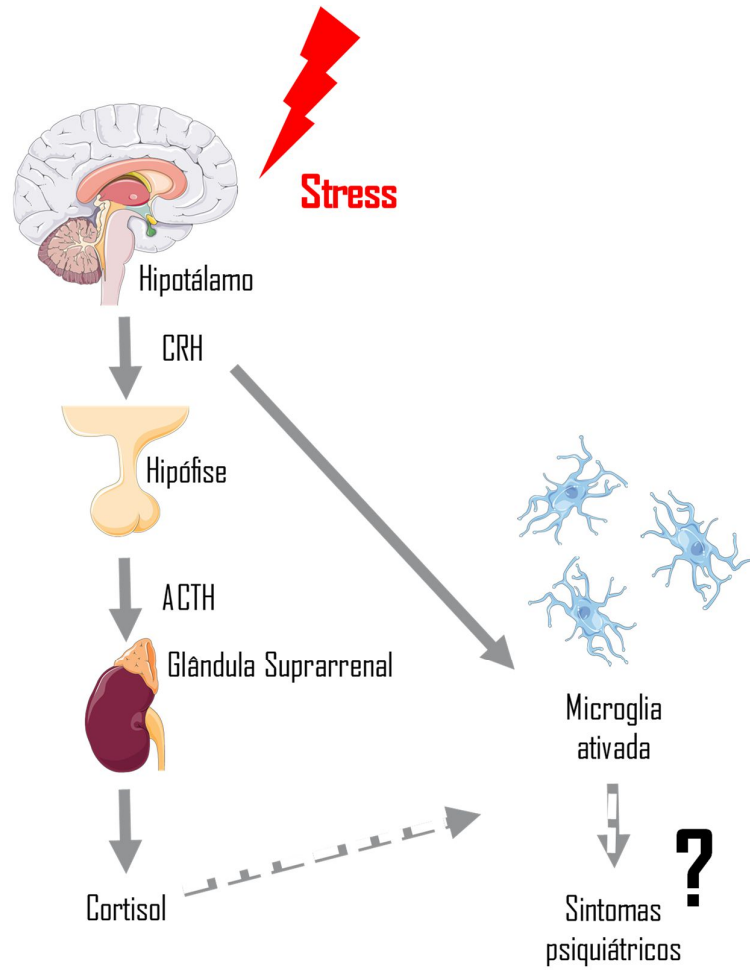


Figura 8| A função do eixo HPA, do RG e da microglia na origem de doenças neuropsiquiátricas. A CRH e os GC, através do eixo HPA, afetam a microglia. Adaptado de (Kato *et al*, 2013a).

## **CAPÍTULO 2**

---

**OBJETIVO**





Os GC sintéticos mais utilizados na prática clínica são a DEX e a BET. Estas moléculas apresentam uma estrutura semelhante, já que são diastereoisómeros epímeros, que variam entre si apenas na orientação do grupo 16-metil (Li, 2012; Peffer *et al*, 2015).

Aquando de risco de parto prematuro (entre as 24 e as 34 semanas de gestação), estes fármacos podem ser administrados a gestantes, com o objetivo de reduzir as morbidades mais comuns encontradas nestes bebês, nomeadamente as doenças pulmonares e a mortalidade neonatal. Esta exposição aos GC exógenos pode influenciar o eixo HPA fetal, com consequências a longo prazo ao nível da resposta ao *stress* (Waffarn & Davis, 2012).

De facto, alguns estudos da literatura demonstram que o desenvolvimento da descendência pode ser afetado pela exposição intrauterina a estes agonistas do RG, o que causa preocupações acerca da segurança desta terapia (Tegethoff *et al*, 2009). Vários resultados do nosso grupo, em animais de experimentação, corroboram esta teoria. Em estudos realizados *in vivo*, o nosso grupo demonstrou que uma administração de DEX em ratas grávidas foi suficiente para alterar a morfologia da microglia na descendência em diferentes idades, dias pós-natal 0, 7 e 90. No dia pós-natal 90, as alterações da morfologia da microglia em ambos os sexos são correlacionadas com mudanças no comportamento do tipo ansioso destes animais (Caetano *et al*, 2017). Além disso, também ao dia pós-natal 90, a DEX provoca hipertrofia neuronal nas dendrites basais e apicais dos neurónios piramidais CA1, no hipocampo da descendência (Pinheiro, 2017). Por sua vez, em estudos *in vitro*, a DEX mostra tendências para alterar as densidades dos diferentes tipos de espinhas dendríticas apicais e basais de fatias organotípicas de hipocampo de ratos com 6 dias de idade (Pinheiro, 2017). Por outro lado, culturas primárias de neurónios hipocampais de fetos em dia gestacional 18, tratadas com DEX, sofreram um efeito contrário em dendrites e axónios; nas primeiras ocorreu uma atrofia e nos segundos uma hipertrofia (Pinheiro *et al*, 2018).

Como demonstrado pelos nossos trabalhos, os neurónios e a microglia sofrem alterações relevantes provocadas por estes fármacos sintéticos. Estas alterações podem afetar o neurodesenvolvimento e a microglia devido à função destas células na formação e eliminação de sinapses (Paolicelli *et al*, 2011), um papel apoiado pela capacidade destas células libertarem mediadores inflamatórios (Parkhurst *et al*, 2013; Lim *et al*, 2013) e de fagocitarem sinapses recém-formadas (Paolicelli *et al*, 2011).

Na clínica, ambos os GC sintéticos são utilizados; por isso, é necessário estabelecer se os dois diastereoisómeros epímeros têm o mesmo efeito sobre as células da microglia e avaliar se um deles possui menos efeitos prejudiciais.

## Objetivo

---

O objetivo principal desta dissertação foi:

- comparar os efeitos da DEX e da BET na fisiologia de uma linha celular de microglia (BV-2), o que poderá refletir a importância de uma alteração estereoquímica entre os GC sintéticos.

Para este propósito foi necessário:

1. identificar os efeitos da DEX e da BET nas células da microglia;
2. verificar se a exposição a curto e longo prazo altera a resposta da linha celular usada;
3. identificar diferenças nas principais funções da microglia envolvidas no neurodesenvolvimento e na regulação do número e no estado das sinapses recém-formadas;
4. identificar se os efeitos promovidos pela incubação de DEX ou BET na linha celular BV-2 são modulados pelo RG. Para isso, é necessário bloquear este recetor usando um antagonista.

## **CAPÍTULO 3**

---

**MÉTODOS**



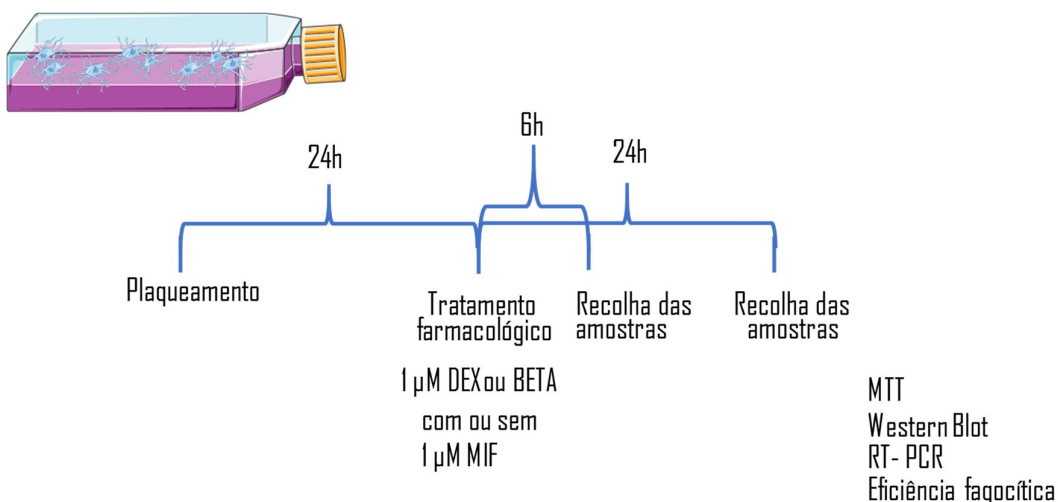
### 3.1. Cultura de células da microglia

A linha celular usada nos estudos realizados *in vitro* foi a linha celular de microglia de ratinho imortalizada, BV-2. As células BV-2 foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado com 10% soro bovino fetal (FBS) e 1% penicilina-estreptomicina (PENSTREP) numa incubadora a 37°C com uma atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) e 95% ar. Para o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), as células BV-2 foram mantidas numa placa com 24 poços, na densidade de 2x10<sup>4</sup> células/poço. Para os ensaios de Western Blot (WB) e de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR), as células foram mantidas numa placa com 6 poços, na densidade de 6x10<sup>4</sup> células/poço. Para o ensaio de avaliação da capacidade fagocítica, as células da microglia foram plaqueadas em lamelas de vidro (16 mm) numa placa de 12 poços, na densidade de 4x10<sup>4</sup> células/poço. Em todos os ensaios as células cresceram até uma confluência de 80-90%.

### 3.2. Tratamento farmacológico celular

Antes de qualquer tratamento farmacológico e depois do seu plaqueamento, as células estabilizaram durante 24 horas. Os fármacos DEX, BET e MIF foram usados na concentração de 1 µM. A MIF, antagonista do RG, foi adicionada imediatamente antes da incubação com DEX ou BET. Neste trabalho, foram avaliados dois tempos de exposição: 6 e 24 horas após a adição de DEX ou BET (Figura 9).

A concentração de DEX (Caetano, 2014) e de MIF (Pinheiro *et al*, 2018) e os tempos de exposição (Caetano, 2014) escolhidos no tratamento farmacológico celular foram suportados por resultados anteriores do nosso grupo de investigação. A BET foi usada na mesma concentração do outro diastereoisómero epímero a fim de comparar os efeitos fisiológicos provocados por ambos e estabelecer uma relação estrutura-atividade.



**Figura 9|** Representação esquemática do tratamento farmacológico da linha celular BV-2 com DEX, BET e MIF. As células BV-2 foram plaqueadas e, após 24 horas de estabilização, as células foram tratadas com 1 µM de DEX, BET e MIF durante 6 ou 24 horas. Em seguida, as células foram recolhidas para realizar os diversos ensaios.

### 3.3. Avaliação da viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular foi escolhido o ensaio colorimétrico com o sal tetrazólio, MTT (Mosmann, 1983). Este ensaio metabólico baseia-se na conversão do MTT (amarelo) a formazan (púrpura) pelas células vivas, uma vez que o MTT apenas penetra as células eucarióticas viáveis (Mosmann, 1983). Esta conversão celular do MTT é uma redução metabólica que ocorre principalmente no citoplasma por ação do dinucleótido de nicotinamida e adenina, NADH (e em menor quantidade pelo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, NADPH) e pelas desidrogenases associadas ao retículo endoplasmático (ER) (Berridge *et al*, 1996, 2005), vesículas de endossomas/lisossomas (Bernas & Dobrucki, 2002) e membrana plasmática (Bernas & Dobrucki, 2000). O produto da biorredução, o formazan, acumula-se como um precipitado insolúvel no interior e à superfície das células e no meio de cultura. Depois, o composto pode ser solubilizado com acidificação do meio, usando ácido clorídrico dissolvido em isopropanol. A quantidade de formazan (diretamente proporcional à quantidade de células viáveis) é medida através da absorvância da solução, a 570 nm, utilizando um espectrofotômetro de leitura em placas e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O comprimento de onda de referência usado para subtrair o *background* foi 620 nm (Riss *et al*, 2004; Stockert *et al*, 2012)

As células BV-2 foram incubadas com 100 µL MTT (5 mg/ml) diretamente dissolvidos no meio de cultura durante 2 horas após 6 ou 24 horas de incubação com os fármacos. Após este tempo, o meio foi descartado e 1 ml isopropanol/ácido clorídrico (HCL) foi adicionado, a fim de dissolver os cristais formados após a incubação com MTT. Para o ensaio de ELISA, foram colocados 200 µL desta solução ácida em placas de 96 poços.

### **3.3.1. Análise dos dados**

Os resultados do ensaio MTT foram expressos como percentagem do controlo (células BV-2 sem qualquer tratamento farmacológico).

## **3.4. Avaliação da densidade do recetor glucocorticóide e do recetor da frataquina**

### **3.4.1. Protocolo de extração e quantificação proteica**

Após 6 ou 24 horas de tratamento farmacológico, as células BV-2 foram lisadas e foi calculada a concentração de proteína total. Para isso, foram mantidas em ambiente gelado e lavadas 2x com solução de tampão fosfato-salino (PBS) a 37°C. Em seguida, foram lisadas e homogeneizadas em tampão RIPA (ensaio de radioimunoprecipitação) [(150 mM cloreto de sódio (NaCl), 50 mM trisaminometano (Tris), 5 mM ácido tetracético de etilenoglicol, 1% Triton X-100, 0,5% Desoxicolato (DOC), 0,1% Dodecil sulfato de sódio (SDS)] suplementado com 1 mM ditioneitol (DTT) e com uma pastilha de inibidores de proteases. Os homogeneizados resultantes foram sonicados em banho de ultrassons durante 1 min e centrifugados a 4°C durante 10 min a 16100 x g. Finalmente, os sobrenadantes foram recolhidos para novos microtubos e armazenados a -80°C até à quantificação da proteína.

A quantificação proteica das amostras foi realizada pelo ensaio colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA). Descrito pela primeira vez por Smith e seus colegas, este método colorimétrico de determinação de proteínas baseia-se na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ , no reagente BCA e nas proteínas das amostras (Brenner & Harris, 1995; Walker, 1994).

A reação do reagente de biureto (fonte de  $\text{Cu}^{2+}$ ) resulta da conversão de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^+$  pelas ligações peptídicas, sob condições alcalinas e dependente da temperatura (Wiechelmann *et al*, 1988; Walker, 1994). O produto  $\text{Cu}^+$  forma um complexo com o BCA, de cor púrpura intensa e uma absorvância na região visível, máximo a 562 nm (Smith *et al*, 1985). Através da comparação com uma proteína padrão conhecida, albumina do soro



## Métodos

---

bovino (BSA), é possível determinar a quantidade de proteína das amostras espectrofotometricamente (Walker, 1994).

Para este ensaio foi necessário preparar uma curva padrão de concentração de BSA (2 mg/ml) com várias diluições sucessivas, em água (H<sub>2</sub>O) miliQ. Depois, a curva padrão de BSA e as amostras foram colocadas, em duplicado, em placas de 96 poços, onde foram diluídas: a curva padrão foi diluída 1:1 em tampão RIPA e as amostras foram diluídas 1:1 em H<sub>2</sub>O miliQ 1:1. Seguiu-se a incubação de 200 µL de reagente BCA nos diferentes poços, durante 30 min a 37°C e protegido da luz. A absorvância das amostras foi medida em ELISA, a 570 nm.

### **3.4.2. Protocolo de fracionamento celular e quantificação proteica**

Este protocolo de extração difere do usado em 3.4.1. uma vez que este permite separar as proteínas localizadas no citoplasma das proteínas localizadas no núcleo e, assim, avaliar a localização do RG a diferentes tempos de exposição. Para isso, e a fim de desencadear a translocação do RG do citoplasma para o núcleo, a linha celular foi tratada com 1 µM DEX ou BET durante 15, 30, 45 e 60 min, após o plaqueamento e estabilização durante 24 horas.

Após este período, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 quente e foram adicionados 250 µL de tampão A [composto por: 10 mM ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico (HEPES), pH=7,9; 10 mM KCl, 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); inibidores de protease; 1 mM DTT e 0,4% nonil fenoxipolietoxietanol (NP-40)] diretamente em cada poço e, em seguida, destacou-se as células, de modo a evitar os aglomerados celulares. A mistura de tampão e células foi deixada em gelo durante 30 min (vortex a cada 10 min) e centrifugada a 4°C durante 5 min a 16 x 100 g. O sobrenadante, fração citoplasmática, foi recolhido e armazenado a -80°C. O precipitado que se formou durante a centrifugação foi vigorosamente ressuspenso com 100 µl de tampão B (composto por: 20 mM HEPES, pH=7,9; 400 mM NaCl, 1 mM EDTA suplementada com 1mM DTT e 10% glicerol). A nova mistura foi deixada em gelo durante 60 min (vortex a cada 20 min), sonicada 1 s num total de 3x e centrifugada a 4°C durante 5 min a 16 x 100 g. O novo sobrenadante, fração nuclear, foi recolhido e armazenado a -80°C.

A quantificação proteica das frações nuclear e citoplasmática foi medida pelo ensaio BCA, como descrito em 3.4.1.. No entanto, os tampões usados para fazer a curva padrão

no ensaio BCA foram: tampão A, para a curva padrão da fração citoplasmática e tampão B, para a curva padrão da fração nuclear.

### **3.4.3. Desnaturação**

As amostras de ambos os protocolos de extração foram desnaturadas com tampão de amostra 6x concentrado (0,5 M Tris-HCl, 30% glicerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,02% azul de bromofenol, pH=6,8) a 95°C, durante 5 min. Cada amostra foi desnaturada com um volume de tampão igual a um quinto do volume de cada amostra.

### **3.4.4. Western Blot**

O WB é uma técnica que permite separar e identificar proteínas específicas de extratos celulares com uma mistura complexa de proteínas. Nesta técnica, as proteínas são separadas com base no seu peso, usando três etapas básicas: separação por tamanho num gel de poliacrilamida, transferência para uma membrana (suporte sólido) e detecção da proteína usando um anticorpo primário e um anticorpo secundário conjugado com uma enzima (Yang & Mahmood, 2012).

No gel de poliacrilamida, as proteínas são separadas por uma eletroforese, migrando em direção ao eletrodo positivo, uma vez que todas têm carga negativa. Esta migração é possível porque a poliacrilamida forma um gel poroso; as proteínas mais pequenas deslocam-se mais facilmente e mais rapidamente que as proteínas maiores. Quanto maior a quantidade de acrilamida, menor o tamanho do poro, resultando numa melhor separação das proteínas (Yang & Mahmood, 2012).

Após a eletroforese, o conteúdo do gel é transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Esta transferência eletroforética usa corrente elétrica para translocar as proteínas do gel para a membrana de PVDF, uma vez que esta é colocada entre a superfície do gel e o eletrodo positivo e assim as proteínas carregadas negativamente podem migrar do gel para a membrana de PVDF. Segue-se o bloqueio da membrana, um passo muito importante para garantir que os anticorpos se liguem a esta especificamente (Yang & Mahmood, 2012).

Como referido anteriormente, para detetar a proteína de interesse é essencial ter um anticorpo primário e um secundário. O anticorpo primário liga-se à proteína de interesse na superfície da membrana. Uma vez que este anticorpo não é marcado, é utilizado um anticorpo secundário marcado (acoplado a uma enzima) dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal onde foi produzido o anticorpo primário. O anticorpo secundário serve também como um mecanismo de amplificação do sinal porque,

## *Métodos*

---

teoricamente, vários anticorpos secundários podem ligar-se simultaneamente ao mesmo anticorpo primário. As duas enzimas mais utilizadas são a fosfatase alcalina e a peroxidase de rabanete. A fosfatase alcalina catalisa a reação do substrato fluorogénico, gerando um fluoróforo estável (550-570 nm) numa reação chamada quimiofluorescência (ECF). Por outro lado, a peroxidase de rabanete catalisa a reação de um reagente de deteção de peróxido e luminol num produto que emite luz a 428 nm numa reação chamada quimiluminescência (ECL) (GE Healthcare, 2011).

Os resultados obtidos com este método são considerados semi-quantitativos, uma vez que não fazem uma medida absoluta da quantidade, mas sim uma comparação relativa do nível proteico (Yang & Mahmood, 2012).

Após quantificação proteica pelo ensaio de BCA e desnaturação, quantidades iguais de proteína, 25 µg, foram carregadas no gel de corrida de poliacrilamida a 8% [8% bisacrilamida, Tris-HCl (1,5 M, pH=8,8), 10% SDS, 10% de persulfato de amónio (APS), 1% tetrametiletenodiamina (TEMED)] com o gel de empilhamento a 4% [4% bisacrilamida, Tris-HCl (0,5 M, pH=6,8), 10% SDS, 10% APS, 2% TEMED]. Para a separação de proteínas, as amostras correram no gel concentrador a 70 V durante 10 min e no gel de corrida a 120 V durante 1 hora com uma solução tampão de bicina (25 mM Tris, 25 mM bicina, 0,1% SDS, pH=8,3). Em seguida, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente do gel para as membranas de PVDF (6x9 cm, Millipore) a 750 mA de corrente durante 1 hora e 30 min, usando a solução tampão de CAPS, ácido [3-(ciclohexilamino)-1-propanossulfónico] com metanol (10 mM CAPS, 10% metanol, pH=11,0). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente numa solução salina tamponada com Tris (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH=7,6) contendo 0,1% polissorbato-20, solução tampão de Tris suplementado com polissorbato 20 (TBS-T) e 5% leite. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído num 1% leite em TBS-T, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, após 1 hora de incubação do anticorpo primário à temperatura ambiente, as membranas foram lavadas (3 x 15 min em TBS-T) e incubadas durante 1 hora e 30 min com o anticorpo secundário respetivo acoplado à peroxidase de rabanete e diluído num 1% leite em TBS-T, à temperatura ambiente. Após a lavagem (3 x 15 min em TBS-T), as bandas foram visualizadas com o kit do método de deteção por ECL. Para verificar se os géis estavam carregados com quantidades semelhantes de proteína, as membranas foram re-incubadas com o anticorpo primário, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), diluído num 1% leite em TBS-T durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após esta nova

incubação e lavagem (3 x 15 min em TBS-T), as membranas foram incubadas durante 1 hora com o respetivo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, à temperatura ambiente. Antes da revelação da segunda incubação com o método de deteção de ECF, as membranas foram lavadas (3 x 15 min em TBS-T). A quantificação manual das intensidades das bandas foi feita utilizando o software *Quantity One* (Bio-Rad).

Foram usados como anticorpos primários e secundários os anticorpos listados na seguinte tabela:

**Tabela 2| Lista de anticorpos primários e secundários e respetivos substratos usados no WB.**

Anticorpo primário	Tampão de desnaturação	Diluição	Proteína (µg)	Peso molecular (kDa)	Referência (cat n°)	Anticorpo secundário	Diluição	Substrato
Anti-RG	Tampão de amostra 6x	1:200	25	90/95	Sc-1004	Anti-coelho	1:10000	ECL
Anti-CX3CR1R	Tampão de amostra 6x	1:5000	25	50	Ab8021	Anti-coelho	1:10000	ECL
Anti-GAPDH	-	1:10000	-	37	Ab0049	Anti-cabra	1:10000	ECF

### 3.4.5. Análise dos dados

Os resultados do WB foram expressos como percentagem do controlo (células BV-2 sem qualquer tratamento farmacológico). Para cada amostra foi necessário subtrair o *background* do sinal e dividir pelo valor de GAPDH. Esta proteína funcionou como controlo positivo, garantindo que possíveis diferenças entre as condições se deviam ao tratamento farmacológico e não a diferentes quantidades de proteína carregadas no gel.

## 3.5. Avaliação da expressão de marcadores de reatividade glial e de mediadores inflamatórios

Esta técnica foi inventada em 1983 por Kary Mullis e, atualmente, é o método mais preciso, sensível e rápido para analisar a expressão genética através da quantificação das sequências de ácidos nucleicos (Brookman-Amissah *et al*, 2011; Eurogentec).

Primeiro, o ácido ribonucleico (ARN) tem de ser isolado das amostras recorrendo a métodos de extração orgânica, como por exemplo, o método que usa o reagente Trizol (Brookman-Amissah *et al*, 2011). Este passo é o mais importante do ensaio porque a qualidade da extração influenciará a qualidade da deteção e da quantificação (Eurogentec). Neste método, é também importante que as amostras tenham quantidade e

## Métodos

---

qualidade de ARN semelhantes. A quantidade de ARN pode ser medida usando a técnica de Nanodrop, sendo que, este instrumento mede a concentração de ARN em ng/μl. Por sua vez, a qualidade do ARN pode ser avaliada através de duas abordagens diferentes: fazendo outra precipitação de ARN (após a primeira precipitação) para eliminar possíveis contaminações de ADN, usando como reagente uma endonuclease que cliva o ADN e/ou através da razão da absorvância a 260/280 nm obtida com o Nanodrop (uma razão de 1,8 indica que o ARN apresenta uma qualidade elevada) (Brookman-Amisshah *et al*, 2011).

Após o isolamento, purificação e quantificação do ARN é necessário convertê-lo para ADN complementar (cADN) porque a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) usa polimerases dependentes do ARN. Esta reação, denominada reação de transcriptase reversa (RT), necessita do ARN que vai ser convertido, dos dNTPs que fornecem os nucleotídeos para a síntese de cADN, dos *primers*, do tampão, do DTT para estabilizar as enzimas, do inibidor de ARN para prevenir a degradação de ARN e de uma enzima RT (Brookman-Amisshah *et al*, 2011).

Para o RT-PCR quantitativo, o *SYBR Green*, que funciona como uma sonda fluorescente específica para a sequência, é usada para a detecção química, permitindo a quantificação do produto amplificado (Eurogentec). Esta sonda tem um aumento significativo na emissão de fluorescência quando se intercala com ADN de cadeia dupla (Brookman-Amisshah *et al*, 2011), sendo que esta intercalação é conjugada com *primers* para amplificar o gene alvo (Eurogentec). A quantidade de sonda incorporada é proporcional à quantidade do gene alvo e a detecção é feita usando fluorescência porque, como referido, a fluorescência que a sonda emite a 520 nm é correlacionada com a quantidade do gene alvo (Eurogentec).

### **3.5.1. Extração de ARN**

Após 6 ou 24 horas de tratamento farmacológico, as células BV-2 foram lisadas. Para este propósito, as células foram lavadas com PBS autoclavado gelado e depois lisadas, utilizando 1 mL de reagente Trizol. Em seguida, as células foram destacadas usando uma ponta de pipeta p1000, congeladas em gelo seco e mantidas a -80°C até aos passos seguintes. Brevemente, as amostras foram descongeladas em gelo e adicionou-se 200 μL clorofórmio. Depois, os microtubos das amostras foram agitados suavemente para homogeneizar a mistura e permaneceram em gelo durante 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7°C durante 15 min a 12000 x g para garantir a distribuição das fases. A fase aquosa superior foi recolhida para um novo microtubo e o

ARN foi precipitado com 400 µL isopropanol e 20 µg glicogénio, adicionado como transportador (*carrier*) para facilitar a precipitação de ARN. Depois, as amostras foram mantidas a -20°C durante a noite e, no dia seguinte, centrifugadas a 4°C durante 30 min a 12.000 x g, levando à formação de um precipitado (ARN). Os precipitados foram lavados duas vezes com etanol a 75% e, novamente, centrifugados a 4°C durante 5 min a 7500 x g. Após centrifugação, o ARN das células foi ressuspensão em H<sub>2</sub>O sem ribonuclease (RNase). Para determinação da concentração e pureza das amostras de ARN, utilizou-se o espectrofotómetro NanoDrop. Após a medição com o NanoDrop, foram eliminadas possíveis contaminações por ADN, tratando as amostras de ARN com desoxirribonuclease I (DNase I, Life technologies). O tratamento com DNase I requer outra precipitação de ARN e a realização dos processos anteriores, adicionar isopropanol e glicogénio durante 1 hora a -20°C, centrifugar a 4°C durante 15 min a 10000 rpm, lavar duas vezes com etanol a 75% e depois, centrifugar novamente a 4°C durante 5 min a 7500 x g. Seguiu-se outra ressuspensão em H<sub>2</sub>O sem RNase e uma nova medida no espectrofotómetro NanoDrop.

### 3.5.2. Síntese de cADN

O cADN de cadeia simples foi sintetizado a partir das amostras de ARN através da reação de TP e utilizando o Kit NZY para síntese de cADN de cadeia simples (Nzytech, Portugal). A reação começa após a mistura de 1 µg de amostra de ARN com 10 µL NZYRT 2x Master Mix e 2µL NZYRT Enzyme Mix a 25°C durante 10 min e, logo de seguida, a 50°C durante 30 min. Um último passo a 85°C durante 5 min foi realizado para inativar a reação. Para remover os híbridos de ARN-ADN remanescentes, as amostras foram tratadas com 1 µL RNase H (E. coli) a 37°C durante 20 min. As amostras de cADN foram diluídas numa proporção de 1:2 com tampão Tris-EDTA (TE) e mantidas a -20°C até à realização do PCR quantitativo em tempo real.

### 3.5.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

As amostras foram carregadas em duplicado numa placa de RT-PCR com 96 poços numa mistura de 2 µl de amostra de cADN diluída 1:2 e 18 µl de uma mistura denominada supermix (7,6 µL H<sub>2</sub>O autoclavada, 10 µL *Syber Green*, 0,4 µL de mistura dos *primers* (200 nM)). Os produtos de amplificação foram detetados usando a sonda *SYBR Green*. O RT-PCR foi realizado utilizando um sistema de PCR em tempo real, StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA), onde a placa foi submetida ao seguinte protocolo:

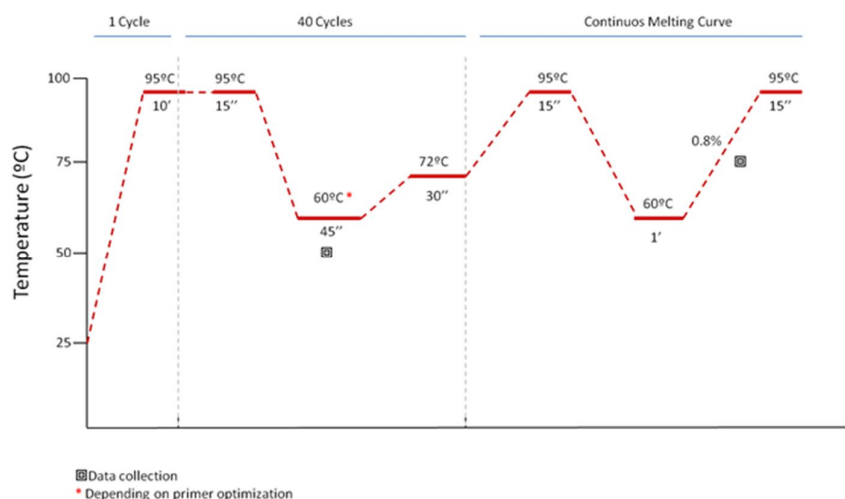


Figura 10| Representação esquemática do protocolo RT-PCR utilizado, incluindo o perfil dos ciclos de temperatura em diferentes etapas.

O RT-PCR foi realizado para avaliar a expressão proteica dos seguintes *primers*. Todos os *primers* foram primeiramente otimizados.

Tabela 3| Lista das sequências dos *primers* usados no RT-PCR (temperatura de *annealing*: temperatura na qual ocorre o *annealing* dos *primers* com cada uma das amostras de ADN de fita simples [Iba-1 (molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1); TSPO (proteína translocadora); A<sub>2A</sub>R (Recetor A<sub>2A</sub> da adenosina); MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade, classe II); TNF (fator de necrose tumoral); iNOS (óxido nítrico sintase indutível); TREM-2 (Recetor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2); Hrpt (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase)].

Gene de interesse	Sequência do <i>primer</i> (Forward/Reverse)	Temperature de <i>Annealing</i> (°C)
Iba-1	TCTGCCATCTTGAGAATGA TGACATCCACCTCCAATC	60
TSPO	AGAAACCCTCTTGGCATCCG ACTATGTAGGAGCCATACCCCA	58
A <sub>2A</sub>	TCCTGCTAATACTACTCTC TCCTCACATTGTTATCTTCTTG	56
MHC-II	GATGCATCTGCTCACGAGGTC ACGCCATCCATGGAGTTCTTA	60
TNF	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT TGCTTTGCTACGACGTGGG	58
IL-10	CTTTGCTATGGTGTCTTTCA TCTCCCTGGTTTCTCTTCC	58
iNOS	TCCTGGACATTACGACCCCT ACTCTGAGGGCTGACACAAG	58
TREM-2	ACAGCACCTCCAGGAATCAAG AACTTGCTCAGGAGAACGCA	60
GAPDH	CGACTTCAACAGCAACTC TGTAGCCGTATTTCATTGTCATA	60
Hrpt	TCCATTCTATGACTGTA CATCTCCACCAATAACTT	55
Ywhaz	CAGCAAGCATACCAAGAAG TCGTAATAGAACACAGAGAAGT	60

### 3.5.4. Análise dos dados

A quantificação relativa da expressão de ARN mensageiro (mARN) foi calculada pelo método do ciclo *threshold* (Ct) comparativo após a subtração do gene *housekeeping* ao gene alvo, para cada amostra. O Ct é o número do ciclo no qual o gráfico de amplificação cruza o limite (nível de fluorescência acima da linha de base, ponto em que o sinal pode ser considerado como não sendo *background* (Eurogentec)) (Brookman-Amisshah *et al*, 2011).

O gene mais estável, de expressão constante em todas as amostras independentemente do tratamento, foi usado como gene *housekeeping*. Foram testados três genes candidatos a *housekeeping*, *Ywhaz*, *Hprt* e *GAPDH* e o gene mais estável entre as amostras foi escolhido, usando uma ferramenta do Excel, o NormFinder *Software* (Andersen *et al*, 2004). Esta ferramenta selecionou o gene *Ywhaz* como o mais estável em todas as condições experimentais.

A diferença de expressão genética entre as amostras tratadas foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Onde,  $\Delta\Delta Ct$ :

$$\begin{aligned} \Delta\Delta Ct = & (Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ Ywhaz})_{\text{amostra tratada}} \\ & - (Ct \text{ gene interesse} - Ct \text{ Ywhaz})_{\text{amostra controle}} \end{aligned}$$

Com este método, todos os resultados foram normalizados para o controle (células BV-2 sem qualquer tratamento farmacológico).

### 3.6. Avaliação da capacidade fagocítica

As células microgliais BV-2 foram incubadas com esferas de látex verde fluorescente 0,00025% (1  $\mu\text{m}$  de diâmetro), dissolvidas diretamente no meio de cultura durante 1 hora após 5 ou 23 horas de incubação com o tratamento farmacológico.

Após 1 hora, as células presentes nas lamelas são lavadas duas vezes com PBS a 37°C, e seguidamente, fixadas com 4% paraformaldeído (PFA)/sacarose durante 10 min. A seguir a uma nova lavagem, incubaram-se as sondas faloidina (1: 500) e 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) (1: 2000), para visualização das células BV-2, já que a faloidina se liga à F-actina e o DAPI ao núcleo. As sondas permanecem durante 40 min nas células e depois disso é feita a última lavagem. Para ser visualizada e



adquirida no Microscópio de Fluorescência, cada lamela foi montada numa lâmina contendo meio de montagem, DAKO *Glycergel Mounting Medium*. Para cada condição foram adquiridas 5 imagens por lamela e o ensaio foi realizado em duplicado.

### **3.6.1. Análise dos dados**

A capacidade fagocítica foi expressa em percentagem da eficiência fagocítica e também na razão entre o número de células fagocíticas e o número total de células em cada imagem. A eficiência fagocítica, previamente descrita por Pan e colaboradores, é calculada através da fórmula,

$$\text{Eficiência fagocítica (\%)} = \frac{(1 \times x_1 + 2 \times x_2 + \dots + n \times x_n)}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times 100\%$$

onde  $x_n$  representa o número de células contendo  $n$  esferas;  $n=1, 2, \dots$  até um máximo de  $n=6$  para mais que 5 esferas incorporadas pelas células. Este cálculo intermediário é dividido pelo número total de células em cada imagem e o resultado final apresentado sob a forma de percentagem (Pan *et al*, 2011).

## **CAPÍTULO 4**

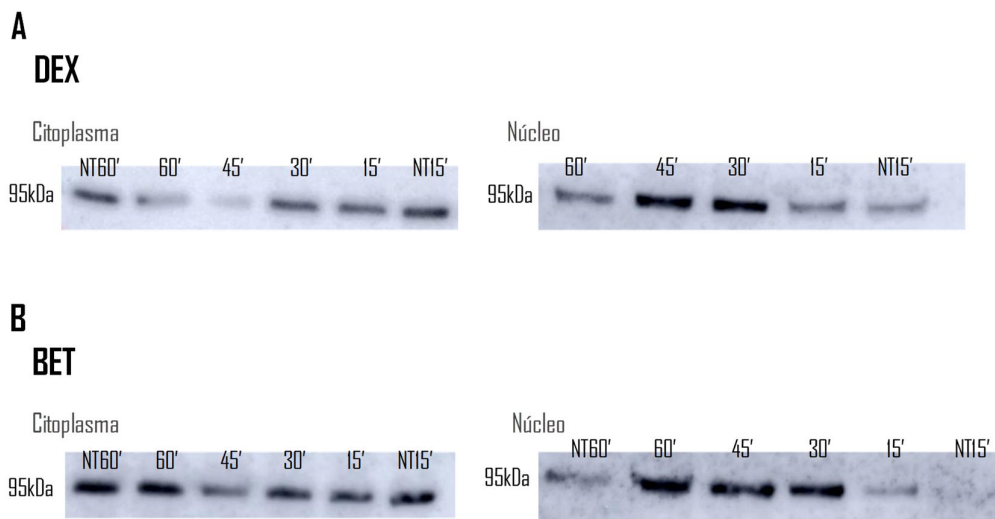
---

**RESULTADOS**



#### 4.1. A exposição a dexametasona e a betametasona desencadeia a translocação do recetor glucocorticóide para o núcleo

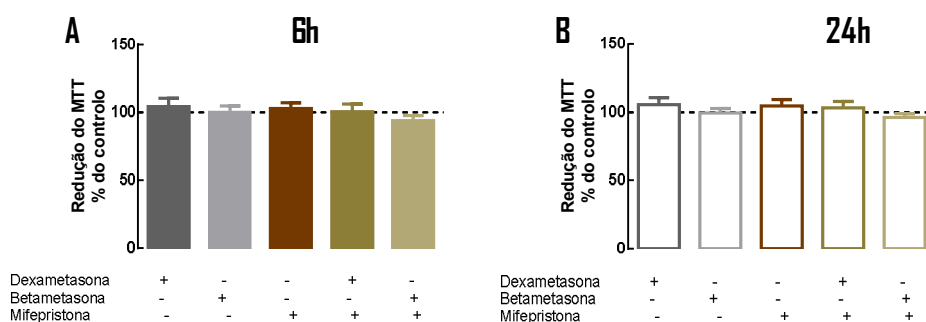
Antes de realizar os estudos funcionais começou-se por verificar se ocorria translocação do RG do citoplasma para o núcleo após a sua ativação com a incubação/ligação dos agonistas, por WB. Após a incubação, as células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo RG. As células foram expostas a 1  $\mu\text{M}$  DEX ou BET em diferentes tempos de exposição: 15, 30, 45 e 60 min e, em seguida, foi avaliada a densidade do RG nas frações citoplasmática e nuclear. Devido ao seu mecanismo de ação (Necela & Cidlowski, 2004; Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006), ambos os agonistas do RG induzem a translocação do recetor citoplasmático para o núcleo, uma vez que a densidade deste aumenta no núcleo e diminui no citoplasma, após exposição aos agonistas.



**Figura 11| Efeito dos diferentes tempos de exposição à DEX (A) e à BET (B) na translocação do RG do citoplasma para o núcleo na linha celular microglial. É visível o aumento da densidade do recetor no núcleo e consequente diminuição no citoplasma, após 30 min de incubação com os GC sintéticos.** As células BV-2 foram tratadas com 1  $\mu\text{M}$  DEX ou BET durante 60, 45, 30 e 15 min. A seguir, as células foram lisadas e as frações subcelulares (citoplasma e núcleo) foram separadas por fracionamento manual e, através de WB foram marcadas para o anticorpo RG. A figura mostra o WB representativo.

## 4.2. A viabilidade da microglia não é afetada após exposição a dexametasona e a betametasona

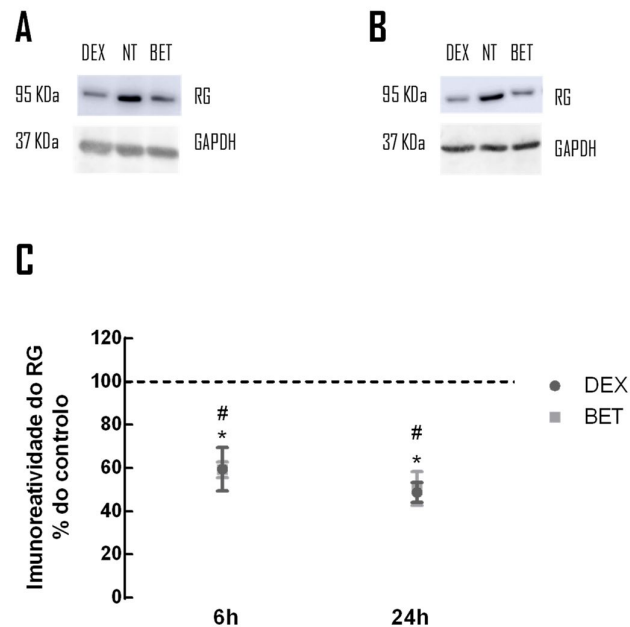
Para verificar o efeito da DEX; BET e MIF na viabilidade das células BV-2 foi feito o ensaio metabólico do MTT. Este ensaio baseia-se na redução do MTT (amarelo) a formazan (púrpura) por células viáveis e posterior quantificação do formazan por ensaio ELISA, a 570 nm (Mosmann, 1983). As células foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX; BET; MIF e com a combinação de 1  $\mu$ M DEX + 1  $\mu$ M MIF e 1  $\mu$ M BET + 1  $\mu$ M MIF durante 6 ou 24 horas. O tratamento com os fármacos e com a combinação dos fármacos não afetou a capacidade das células em converter o MTT e, por esse motivo, não afetou a viabilidade celular em nenhum dos dois momentos da exposição [6h (A): (DEX: 104.45  $\pm$  5.94; BET: 99.79  $\pm$  4.85; MIF: 103.11  $\pm$  3.77; DEX+MIF: 100.56  $\pm$  5.72; BET+MIF: 93.83  $\pm$  3.86), 24h (B): (DEX: 105.85  $\pm$  5.12; BET: 99.66  $\pm$  3.40; MIF: 104.83  $\pm$  4.72; DEX+MIF: 103.33  $\pm$  4.68; BET+MIF: 96.33  $\pm$  3.02), % do NT (células controlo; sem tratamento farmacológico)].



**Figura 12| Efeito da DEX, BET, MIF e da combinação dos fármacos na viabilidade da linha celular microglial após 6 (A) ou 24 horas (B) de exposição.** As células BV-2 foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX; BET ou MIF e 1  $\mu$ M DEX + 1  $\mu$ M MIF e 1  $\mu$ M BET + 1  $\mu$ M MIF durante 6 ou 24 horas e, em seguida, o ensaio metabólico do MTT foi realizado a fim de avaliar a conversão do MTT a formazan por células viáveis. Qualquer um dos fármacos, nos tempos de concentração e exposição utilizados, não afetou a viabilidade das células. (A) Redução do MTT após 6 horas de exposição aos fármacos. (B) Redução do MTT após 24 horas de exposição aos fármacos. Os resultados são apresentados como percentagem das células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM (erro padrão da média); n=7 por condição. (A), (B) O teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados obtidos com as células NT.

### 4.3. A dexametasona e a betametasona diminuem a densidade do recetor glucocorticóide em extratos totais de células microgliais

Para verificar o impacto da exposição a GC sintéticos no RG, foi avaliada a densidade do recetor por WB. Após a incubação, as células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo RG. As células BV-2 foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX e BET; durante 6 ou 24 horas. Estes GC sintéticos diminuem a densidade do seu recetor em cerca de 40% às 6 horas e em 50% às 24 horas, mecanismo adaptativo ao aumento da concentração de ligando disponível (Burnstein *et al*, 1994). Ao diminuir a densidade do recetor as células diminuem a sensibilidade do recetor e evitam a super-estimulação do mesmo (Wallace & Cidlowski, 2001) [6h: (DEX:  $59.62 \pm 10.05$ ; BET:  $59.20 \pm 3.65$ ), 24h: (DEX:  $48.73 \pm 4.50$ ; BET:  $50.54 \pm 7.84$ ), % do NT].

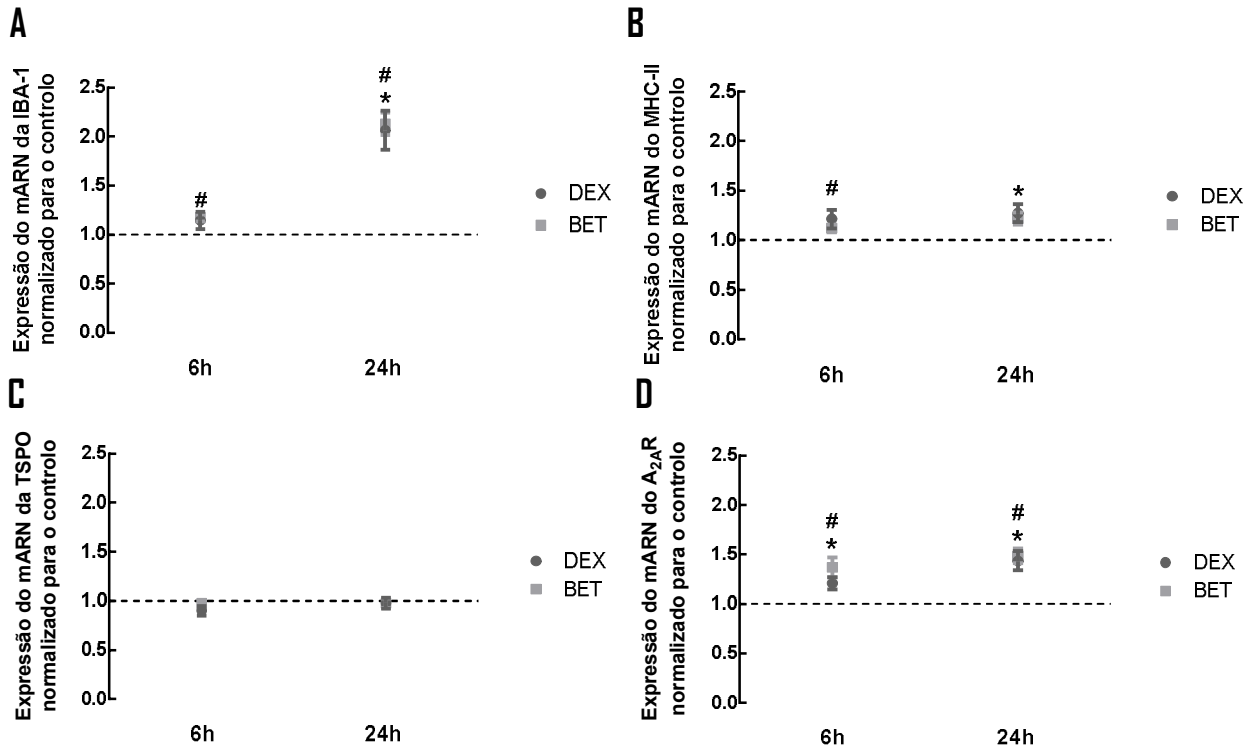


**Figura 13| Efeito da DEX e BET na densidade do RG em células da microglia.** As células BV-2 foram incubadas com agonista do RG, 1  $\mu$ M de DEX ou BET, durante 6 ou 24 horas. As células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo RG. Às 6 e 24 horas, o tratamento com GC sintéticos diminui a densidade do recetor em, aproximadamente, 50%. (A) WB representativo, 6 horas. (B) WB representativo, 24 horas. Os resultados são apresentados como percentagem das células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM;  $n=6-7$  por condição. (C) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: DEX vs NT  $p < 0.05$  (\*), BET vs NT  $p < 0.05$  (\*).

Após avaliação da viabilidade celular e da densidade do RG na microglia e, uma vez que os fármacos foram incorporados pelas células sem interferir com a sua sobrevivência, procedeu-se aos estudos funcionais, avaliando os marcadores de reatividade glial.

### **4.4. A dexametasona e a betametasona aumentam a expressão dos marcadores de reatividade da microglia**

A fim de avaliar a ativação das células da microglia, demonstrada em outros estudos usando um modelo fisiológico de *stress* pré-natal (Diz-Chaves *et al*, 2012, 2013; Ślusarczyk *et al*, 2015), foi avaliada por RT-PCR a expressão de diferentes marcadores de reatividade glial: IBA-1; MHC-II; TSPO. A expressão do A<sub>2A</sub>R também foi avaliada uma vez que há evidências do envolvimento deste recetor em alterações na microglia após exposição a DEX (Caetano *et al*, 2017). Este ensaio quantitativo avaliou o mRNA expresso nas células através do isolamento das amostras com Trizol. As células foram tratadas com 1 µM DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. Às 6 horas observou-se um aumento na expressão do A<sub>2A</sub>R no caso da DEX e um aumento na expressão do IBA-1, MHC-II e A<sub>2A</sub>R no caso da BET. Às 24 horas observou-se um aumento na expressão do IBA-1, MHC-II e A<sub>2A</sub>R no caso da DEX e um aumento na expressão do IBA-1 e A<sub>2A</sub>R no caso da BET. No entanto, não existiram diferenças estatisticamente significativas na expressão dos marcadores de reatividade da microglia entre os dois GC sintéticos [6h: (A): (DEX: 1.147 ± 0.087; BET: 1.173 ± 0.036); (B): (DEX: 1.216 ± 0.093; BET: 1.121 ± 0.038); (C): (DEX: 0.901 ± 0.047; BET: 0.974 ± 0.025); (D): (DEX: 1.209 ± 0.061; BET: 1.371 ± 0.099); 24h: (A): (DEX: 2.063 ± 0.200; BET: 2.129 ± 0.111); (B): (DEX: 1.273 ± 0.090; BET: 1.219 ± 0.059); (C): (DEX: 0.978 ± 0.054; BET: 0.975 ± 0.050); (D): (DEX: 1.435 ± 0.097; BET: 1.485 ± 0.073); normalizado para o NT].



**Figura 14|** Efeito da exposição a DEX e BET na expressão do IBA-1, MHC-II, TSPO e do A<sub>2A</sub>R.

As células BV-2 foram incubadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. O ARN das células foi extraído com trizol, convertido em cADN e a expressão do mRNA dos marcadores de reatividade da microglia foi quantificada por RT-PCR. Em geral, a expressão dos marcadores aumenta com a concentração e com os tempos de exposição utilizados. Os resultados apresentados estão normalizados pelas células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM; n=6 por condição. (A), (B), (C), (D) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: DEX vs NT  $p < 0.05$  (\*), BET vs NT  $p < 0.05$  (#).

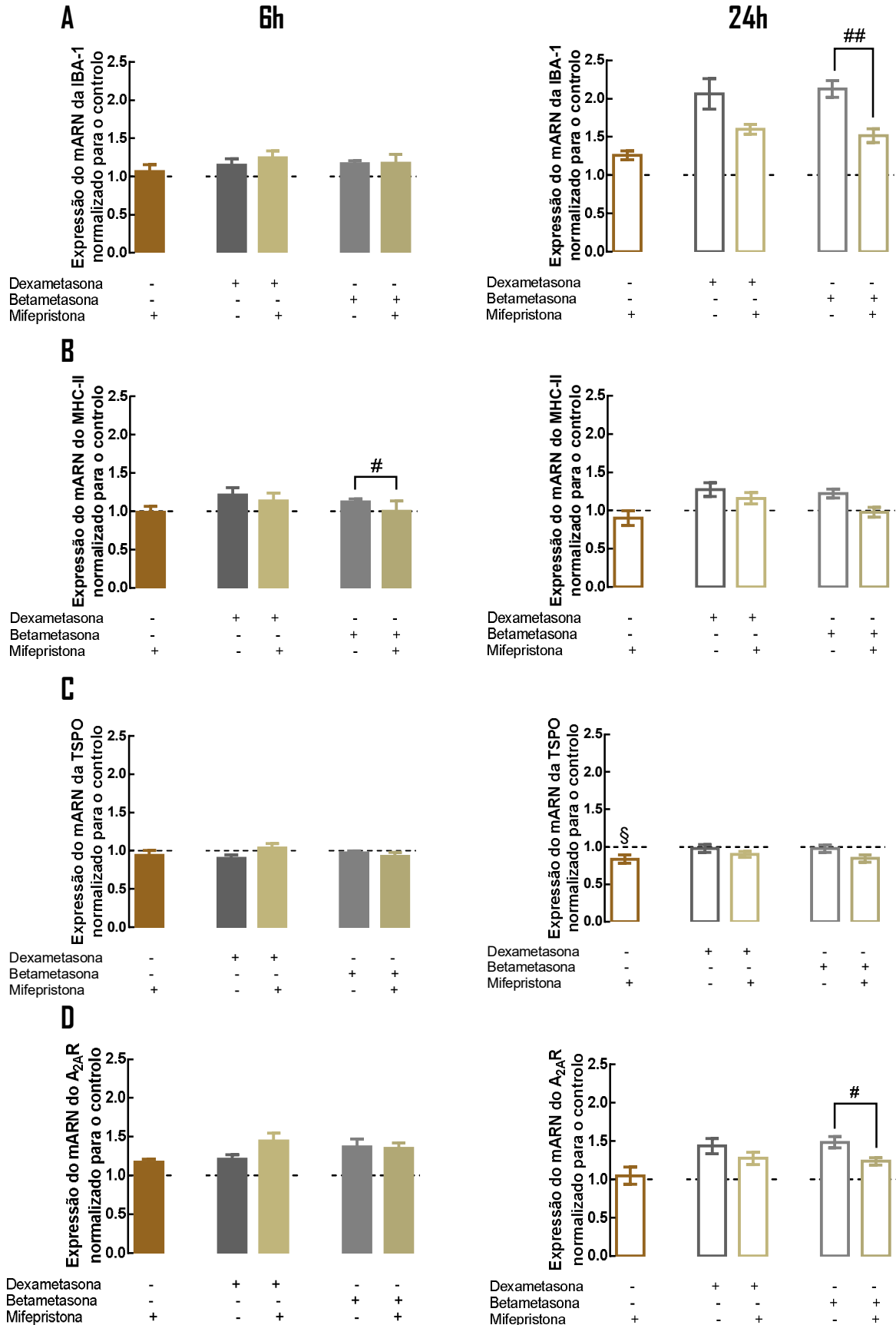
Com o objetivo de confirmar se estas alterações são mediadas pela ligação dos GC sintéticos ao RG, realizaram-se ensaios com o antagonista não seletivo do RG, a MIF. Para isso, 1  $\mu$ M MIF foi adicionado imediatamente antes da incubação com 1  $\mu$ M DEX ou BET e, em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos. Às 6 horas, apenas o aumento na expressão de MHC-II é prevenido pela MIF após a incubação com a BET. Às 24 horas, a incubação de MIF + BET, previne a expressão do mRNA de IBA-1 e A<sub>2A</sub>R. Todas as outras alterações são não mediadas pelo RG [6h: (A): (MIF: 1.063  $\pm$  0.094; DEX+MIF: 1.249  $\pm$  0.089; BET+MIF: 1.178  $\pm$  0.110); (B): (MIF: 0.988  $\pm$  0.080; DEX+MIF: 1.136  $\pm$  0.101; BET+MIF: 1.002  $\pm$  0.132); (C): (MIF: 0.941  $\pm$  0.060; DEX+MIF: 1.039  $\pm$



## *Resultados*

---

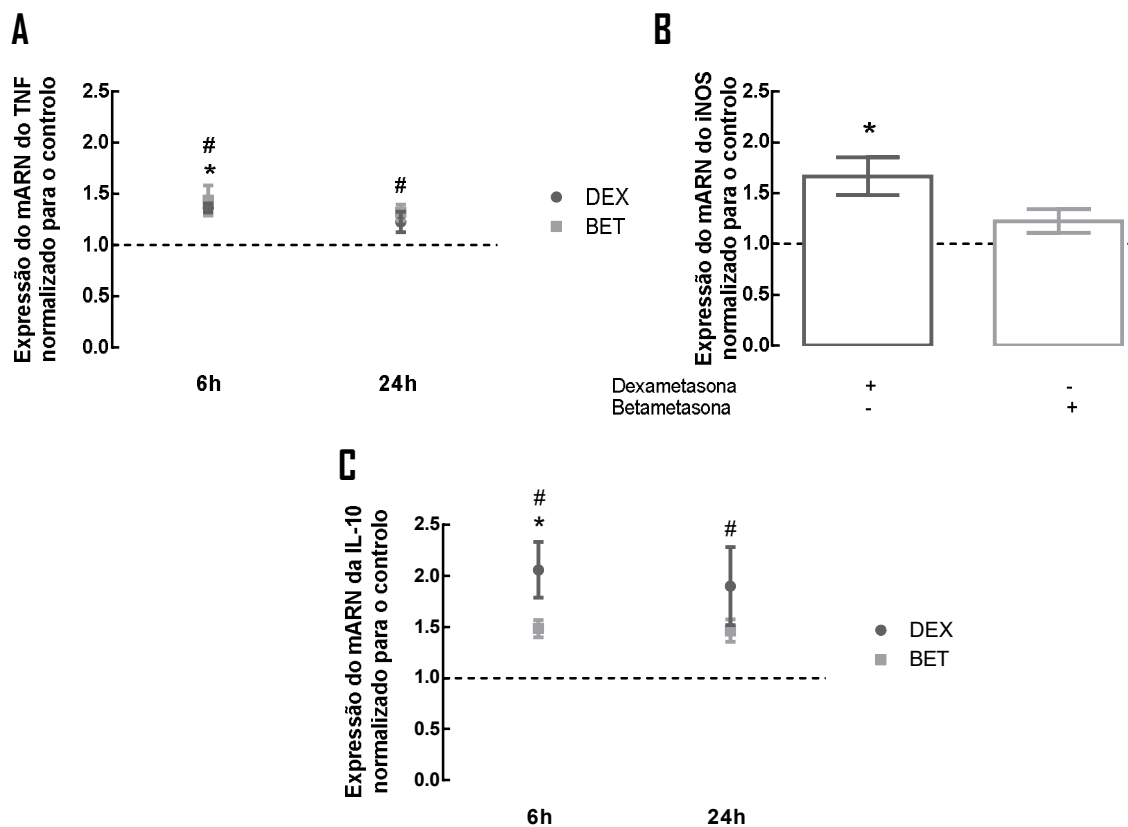
0.057; BET+MIF:  $0.923 \pm 0.054$ ); (D): (MIF:  $1.173 \pm 0.043$ ; DEX+MIF:  $1.448 \pm 0.098$ ; BET+MIF:  $1.350 \pm 0.074$ ); 24h: (A): (MIF:  $1.258 \pm 0.057$ ; DEX+MIF:  $1.600 \pm 0.066$ ; BET+MIF:  $1.517 \pm 0.089$ ); (B): (MIF:  $0.901 \pm 0.096$ ; DEX+MIF:  $1.159 \pm 0.073$ ; BET+MIF:  $0.977 \pm 0.062$ ); (C): (MIF:  $0.837 \pm 0.054$ ; DEX+MIF:  $0.899 \pm 0.039$ ; BET+MIF:  $0.846 \pm 0.049$ ); (D): (MIF:  $1.049 \pm 0.112$ ; DEX+MIF:  $1.276 \pm 0.080$ ; BET+MIF:  $1.236 \pm 0.047$ ); normalizado para o NT].



**Figura 15| Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na expressão de IBA-1, MHC-II, TSPO e do A<sub>2A</sub>R.** As células BV-2 foram incubadas com 1 µM MIF + 1 µM DEX ou 1 µM MIF + 1 µM BET durante 6 ou 24 horas. O ARN das células foi extraído com trizol, convertido em cADN e a expressão de mARN dos marcadores de reatividade da microglia foi quantificada por RT-PCR. A incubação com MIF apenas reverte o aumento da expressão do mARN dos marcadores de reatividade com a BET e exclusivamente para o MHC-II, às 6 horas e também para o IBA-1 e o A<sub>2A</sub>R, às 24 horas. Os resultados apresentados estão normalizados pelas células NT. Cada barra representa a média ± EPM; n=6 por condição. (A), (B), (C), (D) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes: DEX vs DEX+MIF p< 0.05 (\*), BET vs BET+MIF p< 0.05 (#), e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: MIF vs NT p< 0.05 (§).

### 4.5. A dexametasona e a betametasona aumentam a expressão de mediadores inflamatórios

Durante o neurodesenvolvimento, as células da microglia secretam mediadores responsáveis pelo seu envolvimento na formação e eliminação de sinapses (Kettenmann *et al*, 2013). O objetivo deste conjunto de experiências foi avaliar a influência do mediador anti-inflamatório envolvido nesta função, a IL-10 (Lim *et al*, 2013). No entanto, foram também avaliados os mediadores pró-inflamatórios TNF e iNOS, uma vez que estudos em animais usando um modelo de *stress* pré-natal demonstram uma microglia em estado pró-inflamatório, com aumento da expressão de TNF e iNOS (Ślusarczyk *et al*, 2015). As células foram tratadas com 1 µM DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. Ambos os fármacos aumentam as citocinas anti-inflamatória e pró-inflamatórias nos dois momentos de exposição avaliados, sendo que, às 6 horas, a DEX e a BET aumentam a expressão de TNF e IL-10 e, às 24 horas, a DEX aumenta a expressão da iNOS e a BET aumenta a expressão de TNF e IL-10 [6h: (A): (DEX: 1.362 ± 0.045; BET: 1.437 ± 0.147); (C): (DEX: 2.060 ± 0.273; BET: 1.485 ± 0.084)); 24h: (A): (DEX: 1.224 ± 0.101; BET: 1.319 ± 0.078); (B): (DEX: 1.667 ± 0.187; BET: 1.226 ± 0.116); (C): (DEX: 1.899 ± 0.380; BET: 1.464 ± 0.110); normalizado para o NT]. Devido a problemas de sensibilidade do método, não foi possível obter expressão de mARN da iNOS às 6 horas.

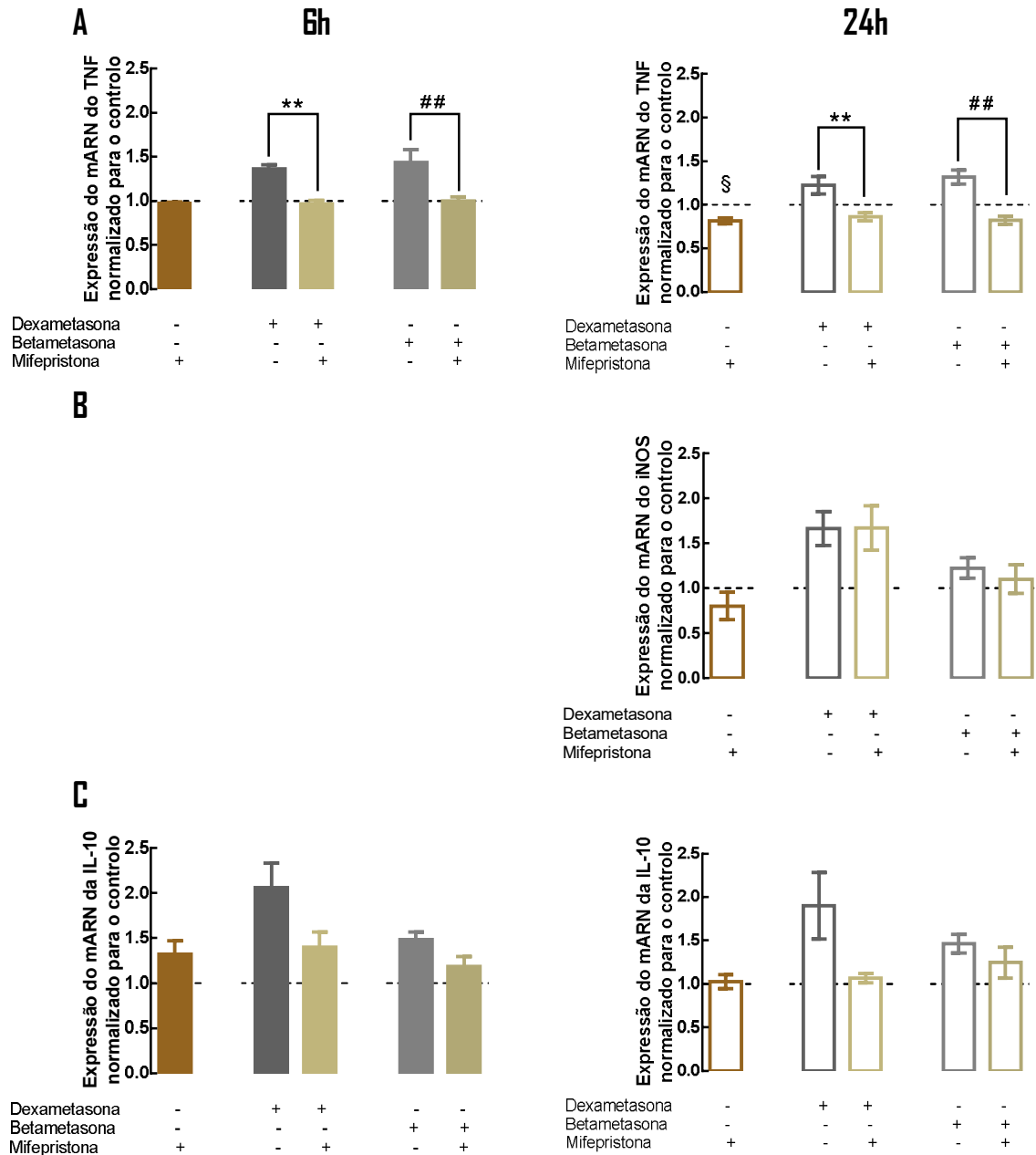


**Figura 16| Efeito da exposição a DEX e BET na expressão de TNF, iNOS e IL-10.** As células BV-2 foram incubadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. O ARN das células foi extraído com trizol, convertido em cADN e a expressão de mARN de mediadores pró e anti-inflamatórios foi quantificada por RT-PCR. Nos tempos de concentração e exposição utilizados, o tratamento com os dois fármacos desencadeia uma resposta idêntica na produção de citocinas inflamatórias. Os resultados apresentados estão normalizados pelas células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM; n=6 por condição. (A), (B), (C) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: DEX vs NT  $p < 0.05$  (\*), BET vs NT  $p < 0.05$  (#).

A fim de confirmar se o aumento na expressão de mediadores inflamatórios se deve à ligação dos GC sintéticos ao RG, incubou-se as células com um antagonista não seletivo, a MIF. Para isso, 1  $\mu$ M MIF foi adicionado imediatamente antes da incubação com 1  $\mu$ M DEX ou BET e, em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos. Apenas o aumento da expressão do mediador pró-inflamatório TNF é mediado pelo RG, uma vez que a expressão é normalizada após incubações com a MIF e os fármacos DEX e BET nos dois tempos de exposição [6h: (A): (MIF:  $0.975 \pm 0.069$ ; DEX+MIF:  $0.968 \pm 0.041$ ;

## Resultados

BET+MIF:  $1.002 \pm 0.045$ ); (C): (MIF:  $1.324 \pm 0.149$ ; DEX+MIF:  $1.404 \pm 0.167$ ; BET+MIF:  $1.186 \pm 0.110$ ); 24h: (A): (MIF:  $0.817 \pm 0.033$ ; DEX+MIF:  $0.864 \pm 0.048$ ; BET+MIF:  $0.823 \pm 0.048$ ); (B): (MIF:  $0.806 \pm 0.151$ ; DEX+MIF:  $1.671 \pm 0.247$ ; BET+MIF:  $1.103 \pm 0.160$ ); (C): (MIF:  $1.028 \pm 0.079$ ; DEX+MIF:  $1.068 \pm 0.052$ ; BET+MIF:  $1.248 \pm 0.178$ ); normalizado para o NT].

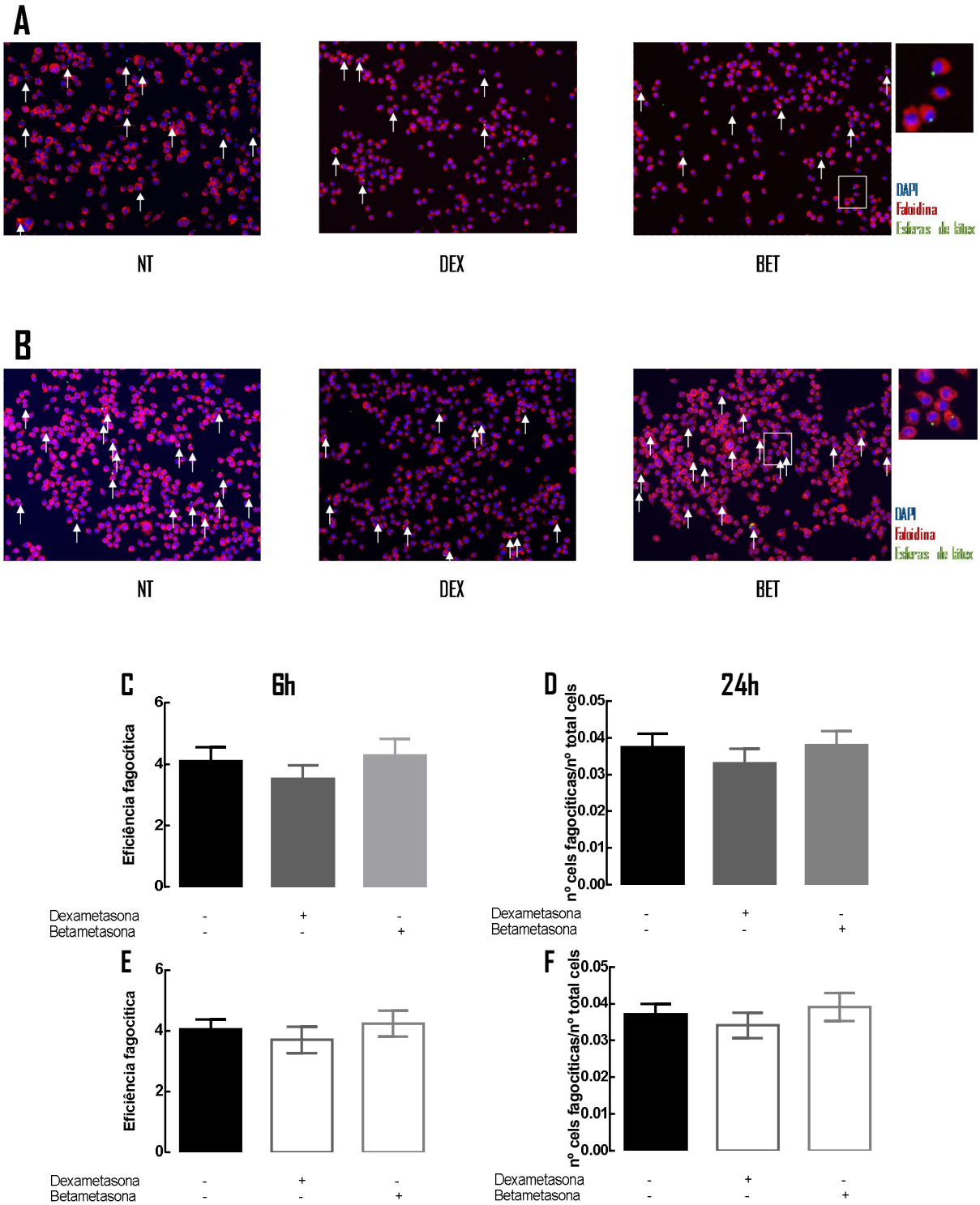


**Figura 17| Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na expressão de TNF, iNOS e IL-10.** As células BV-2 foram incubadas com  $1 \mu\text{M}$  MIF +  $1 \mu\text{M}$  DEX ou  $1 \mu\text{M}$  MIF +  $1 \mu\text{M}$  BET durante 6 ou 24 horas. O ARN das células foi extraído com trizol, convertido em cADN e a expressão de mRNA dos marcadores de reatividade da microglia foi quantificada por RT-PCR.

O RG foi responsável pelo aumento da expressão do mRNA do TNF com ambos os fármacos e nos dois tempos de exposição avaliados. Os resultados apresentados estão normalizados pelas células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM; n=6 por condição. (A), (B), (C), O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes: DEX vs DEX+MIF  $p < 0.05$  (\*), BET vs BET+MIF  $p < 0.05$  (#), e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: MIF vs NT  $p < 0.05$  (§).

#### 4.6. A dexametasona e a betametasona não alteram a capacidade fagocítica

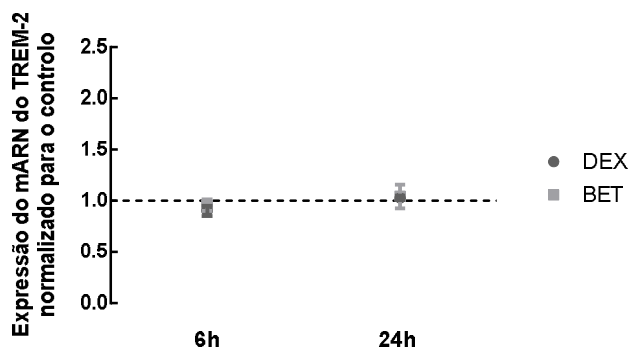
Outra função crucial no desenvolvimento do cérebro é o *pruning* sináptico realizado pela microglia nos neurónios (Reemst *et al*, 2016; Wolf *et al*, 2017). Esta capacidade intrínseca das células microgliais foi avaliada recorrendo a duas técnicas diferentes: incubações com esferas de látex e RT-PCR. O ensaio com esferas de látex avalia a capacidade das células BV-2 incorporarem componentes esféricos. As células foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas e, 1 hora antes do término da incubação, as esferas de látex 0,00025% (1  $\mu$ m de diâmetro) foram incubadas. Os resultados são apresentados de duas formas distintas: a eficiência fagocítica (calculada de acordo com a fórmula referida em 3.6.1.) e a razão entre as células fagocíticas e o número total de células. Nem a eficiência fagocítica nem a relação entre as células fagocíticas e o número total de células foram alteradas com a exposição aos GC sintéticos [6h: (C): (NT:  $4.044 \pm 0.442$ ; DEX:  $3.528 \pm 0.433$ ; BET:  $4.288 \pm 0.562$ ); (D): (NT:  $0.037 \pm 0.003$ ; DEX:  $0.034 \pm 0.004$ ; BET:  $0.038 \pm 0.004$ ); 24h: (E): (NT:  $4.049 \pm 0.312$ ; DEX:  $3.699 \pm 0.434$ ; BET:  $4.360 \pm 0.485$ ); (F): (NT:  $0.039 \pm 0.005$ ; DEX:  $0.038 \pm 0.005$ ; BET:  $0.039 \pm 0.005$ )].



**Figura 18| Efeito da exposição a DEX e BET na eficiência fagocítica e na razão entre células fagocíticas e número total de células.** As células BV-2 foram incubadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. A fagocitose foi avaliada usando esferas de látex fluorescentes e através do Microscópio de Fluorescência. Não há alterações na capacidade fagocítica destas células em ambas as análises. (A) Imagens representativas de células BV-2 coradas com faloidina

(vermelho), DAPI (azul) e com esferas de látex incorporadas (verde), às 6 horas. (B) Imagens representativas de células BV-2 às 24 horas. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM;  $n=6-8$  por condição. (C), (D), O teste *Unpaired T Test* e (E), (F) o teste *Mann-Whitney* foram usados para comparar duas médias independentes.

Recorrendo à técnica de RT-PCR avaliou-se a expressão do mRNA do TREM-2 (Recetor desencadeador expresso nas células mielóides tipo 2). Este recetor está presente nas células da microglia e já foi reportado na literatura o seu envolvimento na capacidade fagocítica (Hickman & El Khoury, 2014; Kawabori *et al*, 2015). As células foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas e avaliadas por RT-PCR. O tratamento com GC sintéticos não afetou a expressão do mRNA do TREM-2, corroborando os resultados anteriores [6h: (DEX:  $0.903 \pm 0.052$ ; BET:  $0.961 \pm 0.056$ ), 24h: (DEX:  $1.031 \pm 0.022$ ; BET:  $1.046 \pm 0.116$ ), normalizado para o NT].



**Figura 19| Efeito da exposição a DEX e BET na expressão do TREM-2.** As células BV-2 foram incubadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. O ARN das células foi extraído com trizol, convertido em cADN e a expressão de mRNA do TREM-2 foi quantificada por RT-PCR. A expressão do mRNA do TREM-2 não sofre qualquer alteração após incubação com os dois fármacos e nos dois tempos de exposição avaliados. Os resultados apresentados estão normalizados pelas células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM;  $n=6$  por condição. (A), (B), (C) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT.

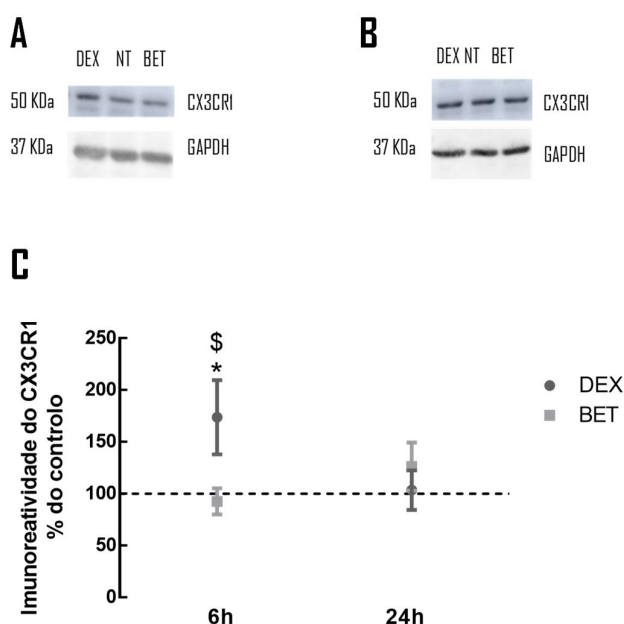
#### 4.7. Apenas a dexametasona aumenta a densidade do recetor da fratalquina

O CX3CR1, é um mediador importante na comunicação entre a microglia e os neurónios através da sinalização CX3CR1/CX3CL1 uma vez que no SNC a microglia é a única célula que expressa este recetor, e os neurónios são a única célula que expressa e



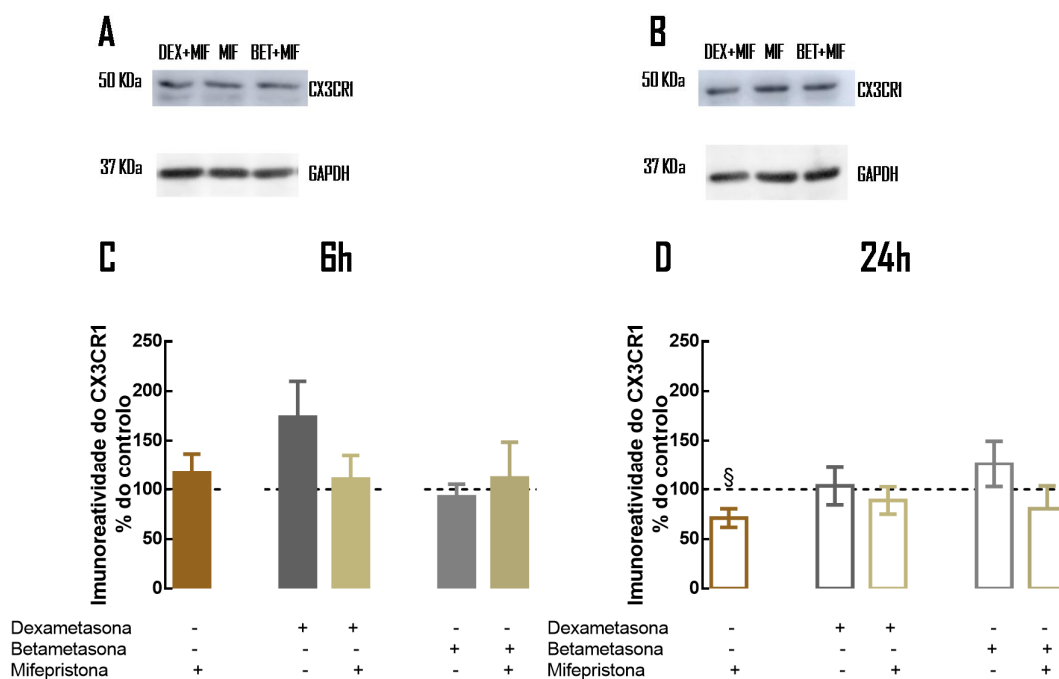
## Resultados

liberta esta molécula, a CX3CL1 (Wolf *et al*, 2013; Paolicelli *et al*, 2014). Para averiguar esta via, a densidade de CX3CR1 foi avaliada por WB. Após a incubação, as células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo CX3CR1. As células BV-2 foram tratadas com 1  $\mu$ M DEX ou BET durante 6 ou 24 horas. O tratamento com DEX aumenta a densidade do CX3CR1. Este aumento é transitório, uma vez que ocorre apenas depois de 6 horas de incubação, exposição a curto prazo, e não foi observado às 24 horas de exposição à DEX, exposição a longo prazo. A BET não interferiu com a densidade do recetor em qualquer um dos momentos de exposição avaliados [6h: (DEX: 173.90  $\pm$  35.88; BET: 103.60  $\pm$  19.03), 24h: (DEX: 92.68  $\pm$  12.56; BET: 126.30  $\pm$  23.24), % do NT].



**Figura 20| Efeito de DEX e BET na densidade do CX3CR1 em células da microglia.** As células BV-2 foram incubadas com agonista do RG, 1  $\mu$ M DEX ou BET, durante 6 ou 24 horas. As células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo CX3CR1. Às 6 horas, o tratamento com DEX aumenta a densidade do recetor em, mais ou menos, 75%. (A) WB representativo, 6 horas. (B) WB representativo, 24 horas. Os resultados são apresentados como percentagem das células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM; n=8-9 por condição. (C) O teste *Mann-Whitney* foi usado para comparar duas médias independentes: DEX vs BET  $p < 0.05$  (\$) e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: DEX vs NT  $p < 0.05$  (\*).

A seguir, realizaram-se ensaios com o antagonista não seletivo do RG, a MIF. Esta experiência permitiu confirmar se o aumento na densidade de CX3CR1 pela DEX era devido à ligação do GC sintético ao seu recetor. Para isso, 1  $\mu$ M MIF foi adicionado imediatamente antes da incubação com 1  $\mu$ M DEX ou BET nas células BV-2 e, em seguida, foram feitos os mesmos procedimentos. O aumento observado na densidade de CX3CR1 com DEX após exposição a curto prazo não foi mediado pelo RG [6h: (MIF: 116.71  $\pm$  19.78; DEX+MIF: 110.48  $\pm$  24.81; BET+MIF: 111.59  $\pm$  37.13), 24h: (MIF: 71.17  $\pm$  9.41; DEX+MIF: 88.94  $\pm$  13.89; BET+MIF: 80.56  $\pm$  23.13), % do NT].



**Figura 21| Efeito do bloqueio do RG pela MIF antes da exposição a DEX e BET na densidade do CX3CR1 em células da microglia.** As células BV-2 foram incubadas com agonista do RG, 1  $\mu$ M DEX ou BET, durante 6 ou 24 horas. As células foram lisadas, desnaturadas e, através de WB foram marcadas para o anticorpo CX3CR1. O RG não é o responsável pelo aumento da densidade do CX3CR1 após 6 horas de exposição com DEX. (A) WB representativo, 6 horas. (B) WB representativo, 24 horas. Os resultados são apresentados como percentagem das células NT. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM; n=6-7 por condição. (C); (D) O teste Mann-Whitney foi usado para comparar duas médias independentes e o teste *Wilcoxon Signed Rank Test* foi usado para comparar os resultados com as células NT: MIF vs NT  $p < 0.05$  (§).



## **CAPÍTULO 5**

---

**DISCUSSÃO**



Introduzido inicialmente por Liggins e Howie, em 1972, o uso de corticosteróides pré-natais DEX e BET, nas gestantes em risco de parto prematuro, foi proposto com o intuito de melhorar a maturação pulmonar do feto e, conseqüentemente, reduzir significativamente a mortalidade e a morbidade neonatal (Liggins & Howie, 1972). Posteriormente, em 1994, o *Consensus Developmental Conference* NIH declarou o uso desta terapia em gestantes com parto prematuro iminente, em idades gestacionais entre as 24 e as 34 semanas (Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes, 1994).

No entanto, nos últimos anos, alguns ensaios clínicos (Rayburn *et al*, 1997; Lee *et al*, 2006, 2008) revelaram que os dois GC com estrutura semelhante (diastereoisómeros epímeros que variam apenas na orientação do grupo 16-metil: orientação  $\alpha$  no caso da DEX e orientação  $\beta$  no caso da BET (Li, 2012)) diferem nos efeitos colaterais causados. Estudos em humanos sugerem que a BET possa ser uma melhor opção, uma vez que ambos os fármacos aumentam a maturação pulmonar fetal, mas a DEX apresenta efeitos secundários mais graves e mais recorrentes, nomeadamente, atraso no desenvolvimento, problemas de audição e o risco de morte neonatal (Rayburn *et al*, 1997; Lee *et al*, 2006, 2008). Uma revisão científica evidencia o aumento de disfunções neuropsiquiátricas em crianças e adultos depois de exposição pré- e/ou neonatal a DEX (Drozdowicz & Bostwick, 2014). Por outro lado, estudos em animais e revisões científicas correlacionaram a administração pré-natal de DEX com efeitos psiquiátricos adversos, nomeadamente com ansiedade (Oliveira *et al*, 2012; Caetano *et al*, 2017) e comportamento do tipo depressivo (Roque *et al*, 2011).

De facto, trabalhos anteriores do nosso grupo, usando o modelo de administração pré-natal de DEX a ratas grávidas, mostraram alterações no neurodesenvolvimento e no comportamento mediados pela microglia, as células imunes do SNC (Caetano *et al*, 2017).

Neste trabalho, estabeleceu-se como objetivo esclarecer se a DEX e a BET interagem da mesma forma com as células da microglia, percebendo melhor a importância de uma alteração estereoquímica entre os diastereoisómeros epímeros. Para tal, utilizou-se uma linha celular microglial, BV-2, e avaliou-se as principais funções destas células: reatividade, libertação de mediadores inflamatórios, fagocitose, densidade de recetores importantes na comunicação com os neurónios e viabilidade, após a exposição a GC sintéticos.

## *Discussão*

---

A resposta celular do RG é dependente da expressão, da translocação para o núcleo e da degradação do próprio recetor (Moraitis *et al*, 2017).

Como referido na introdução, o RG está presente nas células da microglia (Tanaka *et al*, 1997) e também na linha celular BV-2 (Chantong *et al*, 2012). Também descrito na introdução, após a ligação dos agonistas DEX e BET ao seu recetor, o recetor forma um homodímero e ocorre uma rápida translocação do homodímero do citoplasma para o núcleo. No núcleo, pode ligar-se ao ADN para promover a transativação ou transrepressão da expressão genética e/ou atuar por um mecanismo independente da ligação direta ao ADN (Necela & Cidlowski, 2004; Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006; Moraitis *et al*, 2017). Neste trabalho, após 30 min de exposição a DEX e a BET, é visível um aumento da densidade do RG no núcleo das células da microglia. É visível também uma diminuição da densidade do recetor no citoplasma, principalmente após 45 min de incubação com os agonistas. Estas alterações na localização do RG na microglia podem ser correlacionadas com a literatura (Necela & Cidlowski, 2004; Smoak & Cidlowski, 2004; Barnes, 2006; Moraitis *et al*, 2017), sugerindo que o complexo GC sintético-recetor é translocado para o núcleo, atingindo o ADN e outras proteínas.

Antes de prosseguir o trabalho, avaliou-se a integridade celular para garantir que, se existirem alterações nos parâmetros funcionais avaliados, estas se devem ao efeito dos GC sintéticos e não ao efeito citotóxico destes. Nem após 6, nem após 24 horas de exposição a viabilidade da linha celular foi afetada. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, uma vez que Liu e colaboradores não reportaram alterações na viabilidade das BV-2 após 6 horas de exposição a 10  $\mu\text{M}$  de DEX (Liu *et al*, 2016) e Caetano, na sua dissertação de mestrado, mostrou que 24 horas de exposição a 0.1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  DEX não altera a viabilidade das células da microglia N9 (Caetano, 2014). Outro estudo, desta vez realizado em células da microglia N13, avaliando duas concentrações de DEX, 10 e 100  $\mu\text{M}$ , também não reportou alterações na viabilidade após 48 horas de incubação (Yao & Johnson, 1997). Relativamente à MIF, Wong, na sua dissertação de mestrado, demonstrou que este antagonista não afeta a viabilidade da linha BV-2 após uma exposição de 24 horas a 10  $\mu\text{M}$  do fármaco (Wong, 2013). Após estas validações, é de esperar que a incubação com agonista/antagonista não cause alterações na viabilidade celular. Não foram encontrados dados na literatura referentes à influência da BET na viabilidade das células da microglia.

Demonstrado pela primeira vez em 1981 por Cidlowski e seus colegas, e também por Svec e seus colegas, o RG pode regular o seu próprio metabolismo (Cidlowski & Cidlowski, 1981; Svec & Rudis, 1981) através de um mecanismo que ocorre em culturas

celulares e animais, incluindo os humanos, após uma exposição aos ligandos (Burnstein *et al*, 1994). O mecanismo por trás da regulação do recetor reside na via ubiquitina-proteassoma, mediado por enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) e enzimas ligases de ubiquitina (E3) (Moraitis *et al*, 2017), nos microARNs, nomeadamente no miR-124 (Vreugdenhil *et al*, 2009; Clayton *et al*, 2018) e também num mecanismo autorregulatório de repressão (Ramamoorthy & Cidlowski, 2013). A diminuição da regulação do recetor é importante para garantir que uma super-estimulação do mesmo não ocorre na presença de elevados níveis de agonista (Wallace & Cidlowski, 2001) e permite também diminuir a sensibilidade do recetor. Os resultados desta tese estão de acordo com a literatura pois, após uma incubação com DEX e BET durante 6 e 24 horas, a densidade do recetor em extratos totais de células diminui em 40 e 50%, respetivamente, quando comparados com NT.

Todas estas provas de conceito demonstram que os fármacos estão a ser incorporados pelas células e atingem o núcleo, sem comprometer a integridade das mesmas. Assim, foi possível continuar o estudo funcional das células da microglia, avaliando características funcionais das mesmas (marcadores de reatividade glial, libertação de mediadores inflamatórios, fagocitose e comunicação com os neurónios).

A DEX e a BET desencadeiam a mesma resposta celular ao nível dos marcadores de reatividade glial, na libertação de mediadores inflamatórios e na capacidade fagocítica das células nos dois tempos de exposição avaliados. No entanto, apenas a DEX alterou a densidade do CX3CR1 às 6 horas. É importante realçar que este recetor está envolvido na comunicação da microglia com os neurónios, sendo um mediador-chave neste processo.

Como marcadores de reatividade glial foram avaliados o IBA-1, o MHC-II, a TSPO, e o A<sub>2A</sub>R.

A proteína IBA-1 é um membro do grupo de proteínas de ligação ao cálcio e é importante na reorganização do citoesqueleto (Korzhevskii & Kirik, 2016). Na literatura, um aumento na expressão deste marcador está relacionado com um estado de ativação das células da microglia (Bosco *et al*, 2011; Norden *et al*, 2016). Nesta tese, após 24 horas de incubação com DEX e BET, houve um aumento na expressão do mRNA deste marcador nas BV-2.

Por sua vez, o MHC-II é primariamente expresso por células apresentadoras de antigénios, é importante no desencadeamento de respostas imunes (Neefjes *et al*, 2011) e, na literatura, vários autores correlacionam o aumento da sua expressão com microglia



## Discussão

---

ativada (Chew *et al*, 2013; Cherry *et al*, 2014; Pang *et al*, 2016). Os GC sintéticos incubados nas células da microglia desencadeiam a mesma resposta na expressão do mARN do MHC-II após 6 e 24 horas de incubação; no entanto, este aumento é apenas significativo após 6 horas de incubação com BET e de 24 horas de incubação com DEX.

A TSPO é uma proteína hélice transmembranar com 5 domínios, que está localizada principalmente na membrana mitocondrial externa (Papadopoulos *et al*, 2006). Embora possa ser considerada um marcador de reatividade glial, uma vez que pode estar aumentada na microglia depois de uma ativação destas células (Airas *et al*, 2018), relatos na literatura sugerem que a sua expressão não aumenta na microglia humana primária após ativação pró-inflamatória (Owen *et al*, 2017) e 500 nM de DEX também não alteram a sua expressão após 24 horas de incubação em macrófagos (Narayan *et al*, 2017). Os resultados obtidos corroboram estes dois artigos uma vez que, após a incubação dos GC, a expressão do mARN deste marcador de reatividade não apresenta alterações em nenhum dos dois fármacos utilizados em nenhum dos dois momentos avaliados.

Por fim, o A<sub>2A</sub>R é um dos quatro subtipos de recetores da adenosina existentes no organismo estando acoplado a uma proteína G estimulatória (de Lera Ruiz *et al*, 2014). Na literatura, o aumento deste recetor tem sido relacionado com a ativação da microglia (Li *et al*, 2013; Gyoneva *et al*, 2014) e também com a retração dos processos destas células (Li *et al*, 2013; Santiago *et al*, 2014). Neste estudo, a expressão do mARN do A<sub>2A</sub>R está aumentada em ambos os tempos de exposição e também em ambos os fármacos avaliados, corroborando assim a literatura e sugerindo o envolvimento deste recetor nas alterações provocadas pelos fármacos na microglia, como demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Caetano *et al*, 2017).

Assim, com estas evidências é possível concluir que a DEX e a BET ativam a linha celular microglial BV-2.

Esta classe de fármacos, os GC sintéticos, é caracterizada por um efeito anti-inflamatório e, por causa desta propriedade é também caracterizada por aumentar a expressão da IL-10, uma citocina com propriedades anti-inflamatórias (Saraiva & O'Garra, 2010). Durante o desenvolvimento, esta interleucina é também importante devido à sua capacidade de induzir a formação de sinapses (Lim *et al*, 2013). Neste estudo, o aumento do mARN da IL-10 após a incubação com os dois GC vai de encontro ao publicado na literatura uma vez que estes fármacos anti-inflamatórios aumentam a sua expressão (Saraiva & O'Garra, 2010).

No entanto, também foi avaliada a expressão de uma citocina pró-inflamatória, TNF, e de uma enzima pró-inflamatória, iNOS, uma vez que a incubação das células microgliais

com DEX e BET ativa estas células e, quando estas se encontram ativadas são uma fonte de TNF (Bae *et al*, 2014) e iNOS (Spencer *et al*, 2012). Os resultados do estudo corroboram a literatura pois a DEX e a BET ativam as células da microglia (resultados obtidos previamente com o aumento da expressão dos marcadores de reatividade glial) e também aumentam a expressão do mRNA do TNF e da iNOS.

Analisando juntamente os resultados dos marcadores de reatividade e dos mediadores pró-inflamatórios da microglia, estes sugerem que a DEX e a BET ativam a microglia e polarizam estas células num fenótipo M1, fenótipo pró-inflamatório. Este fenótipo é caracterizado por um aumento do MHC-II (Pang *et al*, 2016), da iNOS (Cherry *et al*, 2014; Pang *et al*, 2016) e do TNF (Bae *et al*, 2014; Cherry *et al*, 2014). Os últimos resultados do nosso grupo também sugerem que uma exposição intrauterina a DEX, modelo farmacológico de *stress* pré-natal, pode alterar a morfologia das células da microglia da descendência em diferentes idades e, estas alterações da morfologia em ambos os géneros são correlacionadas com alterações no comportamento do tipo ansioso (Caetano *et al*, 2017). A disfunção da microglia provocada pelos corticosteróides pode fomentar o desenvolvimento de depressão (Nakatani *et al*, 2012).

De facto, em 2010, usando um modelo físico de *stress* pré-natal, foi relatado pela primeira vez alterações no desenvolvimento e na distribuição da microglia, reduzindo o número de células da microglia imaturas, em algumas regiões cerebrais (Gómez-González & Escobar, 2010). Mais tarde, o mesmo tipo de *stress* pré-natal foi correlacionado com alterações no fenótipo das células da microglia nomeadamente, no aumento da IBA-1, do MHC-II, do TNF, da iNOS e da IL-1 $\beta$ , ou seja, características de um microglia ativada e num estado pró-inflamatório (Diz-Chaves *et al*, 2012, 2013; Ślusarczyk *et al*, 2015).

Já existem evidências na literatura sugerindo que a exposição a GC poderá ter efeitos pró-inflamatórios no SNC (Sorrells & Sapolsky, 2007; Sorrells *et al*, 2009; Busillo & Cidlowski, 2013). De facto, o *stress* agudo pode ativar mediadores inflamatórios no SNC. No córtex cerebral, a expressão da iNOS (Madrigal *et al*, 2001), do TNF (Madrigal *et al*, 2002), da prostaglandina E<sub>2</sub> e os níveis da COX-2 (Madrigal *et al*, 2003) estão aumentados após *stress* agudo. É importante realçar que alguns destes efeitos são mediados pelo RG (García-Bueno *et al*, 2008; Sorrells *et al*, 2009). Os efeitos pró-inflamatórios dos GC também dependem da região do cérebro (Sorrells & Sapolsky, 2007) e do tipo de células, uma vez que podem ter efeitos contrários, dependendo do tipo de célula em questão (Sorrells *et al*, 2009). Na periferia, em monócitos humanos, a DEX pode aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (como o recetor do TNF), quimiocinas e proteínas do complemento (Galon *et al*, 2002).

A microglia atua no SNC como um fagócito profissional, uma função crucial na homeostase neuronal, na resposta a lesões (Spencer *et al*, 2012) e no desenvolvimento dos neurónios e do próprio SNC (Miyamoto *et al*, 2013). Esta característica é responsável pela formação dos circuitos neuronais maduros através do *pruning* de sinapses recém-formadas nos neurónios durante os estadios iniciais (Wolf *et al*, 2017; Reemst *et al*, 2016). Na ativação da microglia há um aumento na fagocitose provocado por este estado (Smith, 2001; Chew *et al*, 2013; Fu *et al*, 2014). No entanto, os resultados obtidos neste estudo não corroboram a literatura, uma vez que não há aumento na capacidade fagocítica destas células após avaliação da eficiência fagocítica, da razão entre o número de células fagocíticas e o número total de células e também da expressão do mRNA do TREM-2. O TREM-2 é um recetor presente na superfície da membrana celular da microglia e é responsável pela fagocitose de células apoptóticas (Fu *et al*, 2014).

Por fim, a comunicação entre a microglia e os neurónios foi avaliada através da densidade do CX3CR1 na microglia. De facto, a densidade do CX3CR1 é diferente após a exposição a GC sintéticos, já que esta apenas aumenta após 6 horas de exposição à DEX. Não se observam alterações na densidade do mesmo após 6 horas de exposição com BET nem com 24 horas de exposição com ambos os fármacos. Até à data, na literatura, não se encontra mencionado que a DEX aumente a expressão deste recetor. No entanto, um modelo físico de *stress* pré-natal, através do uso de culturas primárias de microglia, já relatou o aumento da libertação de outras quimiocinas, CCL2 e CXCL12, e também a alteração da expressão dos seus recetores, CCR2 e CXCR4, respetivamente (Ślusarczyk *et al*, 2015). Assim, é importante perceber o significado deste resultado uma vez que este mecanismo está envolvido em muitos processos tais como: sobrevivência de neurónios recém-formados, maturação e eliminação de sinapses, regulação da transmissão sináptica, plasticidade sináptica a logo prazo, neurogénese no hipocampo adulto, conectividade cerebral, aprendizagem, memória e desempenho comportamental (Paolicelli *et al*, 2014). Em estudos anteriores, o nosso grupo demonstrou que a DEX também pode modular os neurónios em diferentes condições. Ao dia pós-natal 90, após exposição intrauterina a DEX, os neurónios piramidais da zona CA1 do hipocampo da descendência sofreram uma hipertrofia nas dendrites basais e apicais; por outro lado, um estudo *in vitro* com fatias organotípicas de hipocampo de ratos com 6 dias de idade, mostrou uma tendência para a DEX alterar a densidade dos diferentes tipos de espinhas dendríticas nas regiões apicais e basais (Pinheiro, 2017). Também no hipocampo, ao dia

gestacional 18, uma cultura primária de neurónios expostos a DEX sofre uma atrofia dendrítica e também uma hipertrofia axonal (Pinheiro *et al*, 2018). É essencial perceber se estas alterações nos neurónios são mediadas pela microglia e também pelo CX3CR1.

É importante ter em consideração todas as alterações que a exposição aos dois GC sintéticos pode provocar na microglia. Estas alterações podem modificar outros processos no neurodesenvolvimento alterando, por exemplo, a constituição do microambiente molecular e/ou desencadeando alterações inflamatórias (Gómez-González & Escobar, 2010) e, podem também afetar o desenvolvimento e atividade dos astrócitos e neurónios (Diz-Chaves *et al*, 2013). De facto, esta excessiva ativação da microglia, o aumento do mARN de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da densidade do CX3CR1 podem contribuir para desencadear processos que levem ao surgimento de doenças psiquiátricas, ao longo da vida.

Em relação à MIF, os resultados sugerem que a inibição por parte deste antagonista apenas medeia o aumento na expressão de IBA-1, de MHC-II e de A<sub>2A</sub>R provocado pela BET e também o aumento na expressão de TNF provocado por ambos os GC sintéticos. Pode-se concluir que os parâmetros avaliados que não apresentam diferença estatisticamente significativa quando incubados com a MIF e comparados com os GC sintéticos, não são mediados pelo RG. A resposta das células é a mesma quando incubada com o antagonista do RG, o que leva a crer que a resposta possa ser mediada pelo outro recetor corticosteróide: o RM.

Este recetor, o RM está presente nas células da microglia (Tanaka *et al*, 1997) e também nas células BV-2 (Nakatani *et al*, 2012). Os GC sintéticos DEX e BET têm afinidade e capacidade de se ligar a este recetor (Lan *et al*, 1982). Uma vez que a MIF é um antagonista potente dos GC e da progesterona e não se liga ao RM (Cadepond *et al*, 1997) pode-se especular que quando os GC não exercem a sua função no RG exercem no RM. Alguns relatos na literatura mostram também que os RG e RM compartilham alguns GRE e podem até ligar-se aos mesmos elementos nos genes-alvo da região promotora (Fuller *et al*, 2000; Brookes *et al*, 2012; Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 2014). No entanto, é necessário realizar estudos usando um antagonista do RM (espironolactona e eplerenona) a fim de validar esta hipótese.



## **CAPÍTULO 6**

---

**CONCLUSÃO**



A DEX e a BET, agonistas do RG, são GC sintéticos com estrutura bastante semelhante (diastereoisómeros epímeros que variam apenas na orientação do grupo 16-metil: orientação  $\alpha$  no caso da DEX e orientação  $\beta$  no caso da BET) (Li, 2012). Estes fármacos podem ser administrados a gestantes em risco de parto prematuro a fim de promover a maturação pulmonar fetal, reduzindo assim o risco de morbilidade e mortalidade neonatal (Feldman *et al*, 2007; Noorlander *et al*, 2014; Haram *et al*, 2017). No entanto, estudos em animais e humanos sugerem que a saúde e o desenvolvimento podem ser afetados na descendência após exposição intrauterina a estes agonistas, aumentando deste modo as preocupações acerca da segurança desta terapia, nomeadamente com a DEX (Tegethoff *et al*, 2009; Drozdowicz & Bostwick, 2014). Portanto, é importante entender os efeitos adversos destes fármacos, principalmente no SNC.

Assim, o objetivo principal do presente estudo visou comparar os efeitos da DEX e da BET nas células imunes do SNC, a microglia, e entender melhor a importância de uma alteração estereoquímica entre os dois GC sintéticos.

Os resultados sugerem que estes fármacos desencadeiam respostas fisiológicas semelhantes em relação aos marcadores de reatividade da microglia, mediadores inflamatórios e fagocitose. Ambos ativam as células microgлияis BV-2 e polarizam-nas num fenótipo M1. Por outro lado, a comunicação entre a microglia e os neurónios, através da avaliação da densidade de CX3CR1 é diferentemente afetada, uma vez que apenas uma exposição de curta duração com DEX altera a densidade deste recetor.

Esta diferença na atividade dos dois diastereoisómeros epímeros pode dever-se à diferença estereoquímica entre eles, já que foi o único parâmetro diferente entre as duas experiências. Pode também ser a responsável pela existência dos efeitos colaterais diferentes entre os dois fármacos e que tornam a DEX mais prejudicial ao organismo através do aparecimento de doenças psiquiátricas, nomeadamente ansiedade (Rayburn *et al*, 1997; Lee *et al*, 2006, 2008; Roque *et al*, 2011; Oliveira *et al*, 2012; Caetano *et al*, 2017; Drozdowicz & Bostwick, 2014). No entanto, estudos adicionais e mais elucidativos são necessários.

A maioria das alterações provocadas pela DEX e pela BET nas células microgлияis BV-2 não são mediadas pelo RG, uma vez que o bloqueio deste recetor não previne as alterações. Evidências na literatura sugerem que o RM possa estar implicado neste processo, já que os GC sintéticos também se ligam a este recetor (Lan *et al*, 1982).





## **CAPÍTULO 7**

---

**PERSPETIVAS FUTURAS**



Após a conclusão desta dissertação e compilação dos resultados obtidos com trabalhos previamente realizados pelo grupo, surgem várias questões que poderão ser respondidas em trabalhos posteriores. Assim, é necessário continuar a investigar o efeito destes GC no cérebro e nomeadamente avaliar:

- as consequências a longo prazo da ativação microglial e da libertação de mediadores inflamatórios provocadas pela exposição aos fármacos;
- as consequências do aumento da densidade do CX3CR1 após curta exposição à DEX;
- se o *pruning* sináptico é afetado e, conseqüentemente, se a formação de circuitos neuronais durante o desenvolvimento se encontra comprometida;
- se a BET também modula a morfologia da microglia, *in vivo*, e se esta hipotética modulação é correlacionada com mudanças de comportamento, em diferentes idades;
- através de estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, se a BET também tem capacidade de alterar a normal composição morfológica das dendrites e também a morfologia dos axónios, nos neurónios;
- se a DEX e a BET também interferem com as condições fisiológicas de outras células pertencentes ao SNC;
- os mecanismos subjacentes às alterações provocadas pela DEX e pela BET, uma vez que algumas delas não são mediadas pelo RG.



## **CAPÍTULO 8**

---

**BIBLIOGRAFIA**



- Airas L, Nylund M & Rissanen E (2018) Evaluation of Microglial Activation in Multiple Sclerosis Patients Using Positron Emission Tomography. *Front. Neurol.* **9**: 1–10 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.00181/full>
- Andersen CL, Jensen JL & Ørntoft TF (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* **64**: 5245–5250 Available at: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Bae K-R, Shim H-J, Balu D, Kim SR & Yu S-W (2014) Translocator Protein 18 kDa Negatively Regulates Inflammation in Microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **9**: 424–437 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11481-014-9540-6>
- Barnes PJ (2006) Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur. Respir. J.* **27**: 413–426 Available at: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.06.00125404>
- Bellavance M-A & Rivest S (2014) The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front. Immunol.* **5**: 1–13 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00136/abstract>
- Bernas T & Dobrucki J (2002) Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* **47**: 236–242 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.10080>
- Bernas T & Dobrucki JW (2000) The Role of Plasma Membrane in Bio-reduction of Two Tetrazolium Salts, MTT, and CTC. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**: 108–116 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986100919076>
- Berridge M, Tan A, McCoy K & Wang R (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*: 4–9
- Berridge M V., Herst PM & Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Anticancer Research* pp 127–152. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387265605110047>
- Bertram C (2002) Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* **124**: 459–467 Available at: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/reprod/124.4.459>
- Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH & Xu HE (2002) Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain



## *Bibliografia*

---

- Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. *Cell* **110**: 93–105 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402008176>
- Bledsoe RK, Stewart EL & Pearce KH (2004) Structure and Function of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain. In *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* pp 49–91. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672904680022>
- Bosco A, Steele MR & Vetter ML (2011) Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J. Comp. Neurol.* **519**: 599–620 Available at:  
<http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=21246546>
- Brenner AJ & Harris ED (1995) A Quantitative Test for Copper Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **226**: 80–84 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269785711943>
- Brookes JC, Galigniana MD, Harker AH, Stoneham AM & Vinson GP (2012) System among the corticosteroids: specificity and molecular dynamics. *J. R. Soc. Interface* **9**: 43–53 Available at:  
<http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2011.0183>
- Brookman-Amisshah N, Packer H, Prediger E, Sabel J, Gunstream S, Hellemans J, Menezes A, Owens B, Rose S, Sander R & Vandesompele J (2011) PrimeTime qPCR Application Guide.
- Burnstein KL, Jewell CM, Sar M & Cidlowski JA (1994) Intragenic sequences of the human glucocorticoid receptor complementary DNA mediate hormone-inducible receptor messenger RNA down-regulation through multiple mechanisms. *Mol. Endocrinol.* **8**: 1764–1773 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708063>
- Busillo JM & Cidlowski JA (2013) The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**: 109–119 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.005>
- Cadepond F, Ulmann, MD A & Baulieu, MD E-E (1997) RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of Action and Clinical Uses. *Annu. Rev. Med.* **48**: 129–156 Available at:  
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.48.1.129>
- Caetano L (2014) Purinergic involvement in microglial responses to immunomodulation during neurodevelopment.
- Caetano L, Pinheiro H, Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Alves ND, Coimbra B, Baptista FI, Henriques SN, Cunha C, Santos AR, Ferreira SG, Sardinha VM, Oliveira JF,

- Ambrósio AF, Sousa N, Cunha RA, Rodrigues AJ, Pinto L & Gomes CA (2017) Adenosine A2A receptor regulation of microglia morphological remodeling-gender bias in physiology and in a model of chronic anxiety. *Mol. Psychiatry* **22**: 1035–1043 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.173>
- Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T & Howes OD (2016) Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. **233**: 1637–1650 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-016-4218-9>
- Carmichael JD & Fleseriu M (2013) Mifepristone: is there a place in the treatment of Cushing's disease? *Endocrine* **44**: 20–32 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12020-012-9846-1>
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W & Lye SJ (2000) Endocrine and Paracrine Regulation of Birth at Term and Preterm 1. *Endocr. Rev.* **21**: 514–550 Available at: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv.21.5.0407>
- Chantong B, Kratschmar D V., Nashev LG, Balazs Z & Odermatt A (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J. Neuroinflammation* **9**: 743 Available at: Journal of Neuroinflammation
- Chapman K, Holmes M & Seckl J (2013) 11 -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol. Rev.* **93**: 1139–1206 Available at: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00020.2012>
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E & Chrousos GP (2003) Pediatric Stress: Hormonal Mediators and Human Development. *Horm. Res. Paediatr.* **59**: 161–179 Available at: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000069325>
- Cherry JD, Olschowka JA & O'Banion M (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* **11**: 98 Available at: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-98>
- Chew L-J, Fusar-Poli P & Schmitz T (2013) Oligodendroglial Alterations and the Role of Microglia in White Matter Injury: Relevance to Schizophrenia. *Dev. Neurosci.* **35**: 102–129 Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/346157>
- Chivers-Wilson KA (2006) Sexual assault and posttraumatic stress disorder: a review of the biological, psychological and sociological factors and treatments. *Mcgill J. Med.* **9**: 111–8 Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1077801209335491>

## *Bibliografia*

---

- Cidlowski NB & Cidlowski JA (1981) Regulation of Glucocorticoid Receptors by Glucocorticoids in Cultured HeLa S3 Cells\*. *Endocrinology* **109**: 1975–1982 Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-109-6-1975>
- Clark R (2008) Glucocorticoid Receptor Antagonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**: 813–838 Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=8&issue=9&spage=813>
- Clayton SA, Jones SW, Kurowska-Stolarska M & Clark AR (2018) The role of microRNAs in glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.* **293**: 1865–1874 Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R117.000366>
- Condon J, Gosden C, Gardener D, Nickson P, Hewison M, Howie AJ & Stewart PM (1998) Expression of Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Corticosteroid Hormone Receptors in Early Human Fetal Life 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 4490–4497 Available at: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.83.12.5302>
- Cottrell EC & Seckl JR (2009) Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front. Behav. Neurosci.* **3**: 1–9 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.08.019.2009/abstract>
- Cristovão G, Pinto MJ, Cunha RA, Almeida RD & Gomes CA (2014) Activation of microglia bolsters synapse formation. *Front. Cell. Neurosci.* **8**: Available at: <http://www.nature.com/articles/nn1472>
- Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, González B & Castellano B (1997) Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **377**: 70–84 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9861%2819970106%29377%3A1%3C70%3A%3AAID-CNE7%3E3.0.CO%3B2-G>
- Dalmau I, Finsen B & Zimmer J (1998) Development of Microglia in the Postnatal Rat Hippocampus. **474**: 458–474 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%28SICI%291098-1063%281998%298%3A5%3C458%3A%3AAID-HIPO6%3E3.0.CO%3B2-N>
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML & Gan W-B (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**: 752–758 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn1472>

- Diederich S, Eigendorff E, Burkhardt P, Quinkler M, Bumke-Vogt C, Rochel M, Seidelmann D, Esperling P, Oelkers W & Bähr V (2002) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 5695–701 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466373>
- Diz-Chaves Y, Astiz M, Bellini MJ & Garcia-Segura LM (2013) Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice. *Brain. Behav. Immun.* **28**: 196–206 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.013>
- Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P & Garcia-Segura LM (2012) Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J. Neuroinflammation* **9**: 580 Available at: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-9-71>
- Drozdowicz LB & Bostwick JM (2014) Psychiatric Adverse Effects of Pediatric Corticosteroid Use. *Mayo Clin. Proc.* **89**: 817–834 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.01.010>
- Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes (1994) *NIH Consensus State* **12**: 1–24 Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1995.03520290065031>
- Eurogentec qPCR guide.
- Falah N & Haas DM (2014) Antenatal corticosteroid therapy: Current strategies and identifying mediators and markers for response. *Semin. Perinatol.* **38**: 528–533 Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2014.08.018>
- Feldman DM, Carbone J, Belden L, Borgida AF & Herson V (2007) Betamethasone vs dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. : 1–4 Available at: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(07\)00877-0/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(07)00877-0/fulltext)
- França MS, Moron AF, Araujo Júnior E, Avedissian M, Pares DBS, Nardoza LMM, Jaqueta CB & Mello LEAM (2016) Neonatal neuronal apoptosis after betamethasone administration in pregnant Wistar rats. *J. Matern. Neonatal Med.* **29**: 1089–1093 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2015.1035639>
- Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR & Maier SF (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E. coli lipopolysaccharide. *Brain. Behav. Immun.* **24**: 19–30 Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2009.07.008>

Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ & Tang Y (2014) Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol. Neurobiol.* **49**: 1422–1434 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-013-8620-6>

Fuller PJ, Lim-Tio SS & Brennan FE (2000) Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action. *Kidney Int.* **57**: 1256–1264 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815468656>

Gallagher P & Young AH (2006) Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2**: 33–42 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412444>

Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'shea JJ, Chrousos GP & Bornstein SR (2002) Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.* **16**: 61–71 Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.01-0245com>

García-Bueno B, Madrigal JLM, Pérez-Nievas BG & Leza JC (2008) Stress Mediators Regulate Brain Prostaglandin Synthesis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation after Stress in Rats. *Endocrinology* **149**: 1969–1978 Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2007-0482>

GE Healthcare (2011) Western Blotting Principles and Methods

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D & Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **7**: 1–14 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00045/abstract>

Gómez-González B & Escobar A (2010) Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathol.* **119**: 303–315 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-009-0590-4>

Gomez-Sanchez E & Gomez-Sanchez CE (2014) The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. In *Comprehensive Physiology* pp 965–994. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130044>

Grossmann C, Scholz T, Rochel M, Bumke-Vogt C, Oelkers W, Pfeiffer A, Diederich S & Bahr V (2004) Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur. J. Endocrinol.* **151**: 397–406 Available at: <http://www.eje-online.org/cgi/doi/10.1530/eje.0.1510397>

- Gyoneva S, Davalos D, Biswas D, Swanger SA, Garnier-Amblard E, Loth F, Akassoglou K & Traynelis SF (2014) Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. *Glia* **62**: 1345–1360 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625715001352>
- Haram K, Mortensen JH, Magann EF & Morrison JC (2017) Antenatal corticosteroid treatment: factors other than lung maturation. *J. Matern. Neonatal Med.* **30**: 1437–1441 Available at:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767058.2016.1219716>
- Harris A & Seckl J (2011) Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm. Behav.* **59**: 279–289 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.007>
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK & Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **29**: 1201–1213 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584605002691>
- Hickman SE & El Khoury J (2014) TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **88**: 495–498 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.021>
- Iqbal M, Audette MC, Petropoulos S, Gibb W & Matthews SG (2012) Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* **33**: 137–142 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.008>
- Iqbal M, Gibb W & Matthews SG (2011) Corticosteroid Regulation of P-Glycoprotein in the Developing Blood-Brain Barrier. *Endocrinology* **152**: 1067–1079 Available at:  
<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2010-1227>
- Jobe AH, Nitsos I, Pillow JJ, Polglase GR, Kallapur SG & Newnham JP (2009) Betamethasone dose and formulation for induced lung maturation in fetal sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **201**: 611.e1-611.e7 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371490>
- Jobe AH & Soll RF (2004) Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **190**: 878–881 Available at: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(04\)00105-X/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(04)00105-X/fulltext)
- Kato TA, Hayakawa K, Monji A & Kanba S (2013a) Missing and Possible Link between Neuroendocrine Factors, Neuropsychiatric Disorders, and Microglia. *Front. Integr.*

- Neurosci.* **7**: 1–16 Available at:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2013.00053/abstract>
- Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Hashioka S, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Utsumi H & Kanba S (2011) Anti-Inflammatory Properties of Antipsychotics Via Microglia Modulations: Are Antipsychotics a ‘Fire Extinguisher’ in the Brain of Schizophrenia? *Mini-Reviews Med. Chem.* **11**: 565–574 Available at:  
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=11&issue=7&spage=565>
- Kato TA, Yamauchi Y, Horikawa H, Monji A, Mizoguchi Y, Seki Y, Hayakawa K, Utsumi H & Kanba S (2013b) Neurotransmitters, psychotropic drugs and microglia: clinical implications for psychiatry. *Curr. Med. Chem.* **20**: 331–44 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157624> [Accessed June 12, 2018]
- Kawabori M, Kacimi R, Kauppinen T, Calosing C, Kim JY, Hsieh CL, Nakamura MC & Yenari MA (2015) Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Deficiency Attenuates Phagocytic Activities of Microglia and Exacerbates Ischemic Damage in Experimental Stroke. *J. Neurosci.* **35**: 3384–3396 Available at:  
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2620-14.2015>
- Kettenmann H, Kirchhoff F & Verkhratsky A (2013) Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**: 10–18 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS & Joëls M (1998) Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocr. Rev.* **19**: 269–301 Available at:  
<https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv.19.3.0331>
- Korzhevskii DE & Kirik O V. (2016) Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* **46**: 284–290 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11055-016-0231-z>
- Lan NC, Graham B, Bartter FC & Baxter JD (1982) Binding of Steroids to Mineralocorticoid Receptors: Implications for in Vivo Occupancy by Glucocorticoids\*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**: 332–342 Available at:  
<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-54-2-332>
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P & Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**: 151–170 Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030645229090229W>

- Lee BH, Stoll BJ, McDonald SA & Higgins RD (2006) Adverse Neonatal Outcomes Associated With Antenatal Dexamethasone Versus Antenatal Betamethasone. *Pediatrics* **117**: 1503–1510 Available at:  
<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2005-1749>
- Lee BH, Stoll BJ, McDonald SA & Higgins RD (2008) Neurodevelopmental Outcomes of Extremely Low Birth Weight Infants Exposed Prenatally to Dexamethasone Versus Betamethasone. *Pediatrics* **121**: 289–296 Available at:  
<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2007-1103>
- de Lera Ruiz M, Lim Y-H & Zheng J (2014) Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor as a Drug Discovery Target. *J. Med. Chem.* **57**: 3623–3650 Available at:  
<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm4011669>
- Levine S (1957) Infantile Experience and Resistance to Physiological Stress. *Science* (80- . ). **126**: 405–405 Available at:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.126.3270.405>
- Li M (2012) Organic Chemistry of Drug Degradation Cambridge: Royal Society of Chemistry Available at: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781849735360>
- Li Z, Li W, Li Q & Tang M (2013) Extracellular nucleotides and adenosine regulate microglial motility and their role in cerebral ischemia. *Acta Pharm. Sin. B* **3**: 205–212 Available at:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383513000592%5Cnpapers3:/publication/doi/10.1016/j.apsb.2013.06.003>
- Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN & Wong WT (2009) Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **50**: 4444 Available at:  
<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.08-3357>
- Liggins GC (1969) Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocrinol.* **45**: 515–523 Available at: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/joe.0.0450515>
- Liggins GC & Howie RN (1972) A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **50**: 515–25 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561295>
- Lim S-H, Park E, You B, Jung Y, Park A-R, Park SG & Lee J-R (2013) Neuronal Synapse



## *Bibliografía*

---

- Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS One* **8**: e81218 Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081218>
- Liu H, Shi H, Huang F, Peterson KE, Wu H, Lan Y, Zhang B-B, He Y-X, Woods T, Du M, Wu X-J & Wang Z-T (2016) Astragaloside IV inhibits microglia activation via glucocorticoid receptor mediated signaling pathway. *Sci. Rep.* **6**: 19137 Available at: <http://www.nature.com/articles/srep19137>
- Madrigal JLM, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L & Leza JC (2002) The Increase in TNF- $\alpha$  Levels Is Implicated in NF- $\kappa$ B Activation and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Brain Cortex after Immobilization Stress. *Neuropsychopharmacology* **26**: 155–163 Available at: [http://www.nature.com/doi/10.1016/S0893-133X\(01\)00292-5](http://www.nature.com/doi/10.1016/S0893-133X(01)00292-5)
- Madrigal JLM, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L & Leza JC (2001) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor  $\kappa$ B-mediated mechanisms. *J. Neurochem.* **76**: 532–538 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2001.00108.x>
- Madrigal JLM, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernández AP, Rodrigo J, Boscá L & Leza JC (2003) Induction of Cyclooxygenase-2 Accounts for Restraint Stress-Induced Oxidative Status in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1579–1588 Available at: <http://www.nature.com/articles/1300187>
- Matthews SG, Owen D, Banjanin S & Andrews MH (2002) Glucocorticoids, hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) development, and life after birth. *Endocr. Res.* **28**: 709–718 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/ERC-120016991>
- McCabe L, Marash D, Li A & Matthews SG (2001) Repeated Antenatal Glucocorticoid Treatment Decreases Hypothalamic Corticotropin Releasing Hormone mRNA but not Corticosteroid Receptor mRNA Expression in the Fetal Guinea-Pig Brain. *J. Neuroendocrinol.* **13**: 425–431 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2826.2001.00649.x>
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ & Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* **101**: 249–255 Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004010000284>
- Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ & Nabekura J (2013) Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front. Cell.*

- Neurosci.* **7**: 1–6 Available at:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00070/abstract>
- Moisiadis VG & Matthews SG (2014) Glucocorticoids and fetal programming part 2: mechanisms. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**: 403–411 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863383>
- Monji A, Kato T & Kanba S (2009) Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **63**: 257–265 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579286>
- Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S & Kanba S (2013) Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **42**: 115–121 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.12.002>
- Moraitis AG, Block T, Nguyen D & Belanoff JK (2017) The role of glucocorticoid receptors in metabolic syndrome and psychiatric illness. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **165**: 114–120 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.023>
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
- Myers B, McKlveen JM & Herman JP (2014) Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Front. Neuroendocrinol.* **35**: 180–196 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.12.003>
- Nakatani Y, Amano T, Tsuji M & Takeda H (2012) Corticosterone suppresses the proliferation of BV2 microglia cells via glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptor. *Life Sci.* **91**: 761–770 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.019>
- Narayan N, Mandhair H, Smyth E, Dakin SG, Kiriakidis S, Wells L, Owen D, Sabokbar A & Taylor P (2017) The macrophage marker translocator protein (TSPO) is down-regulated on pro-inflammatory 'M1' human macrophages. *PLoS One* **12**: e0185767 Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185767>
- Necela BM & Cidlowski J a (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**: 239–246 Available at: <http://pats.atsjournals.org/cgi/doi/10.1513/pats.200402-005MS>
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P & Bakke O (2011) Towards a systems understanding of

## *Bibliografia*

---

- MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 823–836  
Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3084>
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F & Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-. )*. **308**: 1314–1318  
Available at: <http://science.sciencemag.org/content/308/5726/1314.long>
- Noorlander CW, Tijsseling D, Hessel EVS, de Vries WB, Derks JB, Visser GHA & de Graan PNE (2014) Antenatal Glucocorticoid Treatment Affects Hippocampal Development in Mice. *PLoS One* **9**: e85671 Available at:  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085671>
- Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E & Godbout JP (2016) Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* **64**: 300–316  
Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22930>
- O'Connor TG, Winter MA, Hunn J, Camahan J, Pressman EK, Glover V, Robertson-Blackmore E, Moynihan JA, Lee FE-H & Caserta MT (2013) Prenatal maternal anxiety predicts reduced adaptive immunity in infants. *Brain. Behav. Immun.* **32**: 21–28 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.002>
- Oliveira M, Bessa JM, Mesquita A, Tavares H, Carvalho A, Silva R, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OFX & Sousa N (2006) Induction of a Hyperanxious State by Antenatal Dexamethasone: A Case for Less Detrimental Natural Corticosteroids. *Biol. Psychiatry* **59**: 844–852 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322305010097>
- Oliveira M, Rodrigues A-J, Leão P, Cardona D, Pêgo JM & Sousa N (2012) The bed nucleus of stria terminalis and the amygdala as targets of antenatal glucocorticoids: implications for fear and anxiety responses. *Psychopharmacology (Berl)*. **220**: 443–453 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-011-2494-y>
- Owen DR, Narayan N, Wells L, Healy L, Smyth E, Rabiner EA, Galloway D, Williams JB, Lehr J, Mandhair H, Peferoen LAN, Taylor PC, Amor S, Antel JP, Matthews PM & Moore CS (2017) Pro-inflammatory activation of primary microglia and macrophages increases 18 kDa translocator protein expression in rodents but not humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**: 2679–2690 Available at:  
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0271678X17710182>
- Pan X, Zhu Y, Lin N, Zhang J, Ye Q, Huang H & Chen X (2011) Microglial phagocytosis

- induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid is attenuated by oligomeric  $\beta$ -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **6**: 45 Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718498>
- Pang Y, Dai X, Roller A, Carter K, Paul I, Bhatt AJ, Lin RCS & Fan L-W (2016) Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PLoS One* **11**: e0164403 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0164403>
- Paolicelli RC, Bisht K & Tremblay M-Ã (2014) Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front. Cell. Neurosci.* **8**: 1–10 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00129/abstract>
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D & Gross CT (2011) Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science (80-. )*. **333**: 1456–1458 Available at:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1202529>
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère J-J, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang M-R & Gavish M (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 402–409 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614706001532>
- Pariante CM & Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* **31**: 464–468 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223608001641>
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR & Gan W (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* **155**: 1596–1609 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413014815>
- Peffer ME, Zhang JY, Umfrey L, Rudine AC, Monaghan AP & DeFranco DB (2015) Minireview: The Impact of Antenatal Therapeutic Synthetic Glucocorticoids on the Developing Fetal Brain. *Mol. Endocrinol.* **29**: 658–666 Available at:  
<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2015-1042>
- Phillips DIW (2007) Programming of the stress response: a fundamental mechanism underlying the long-term effects of the fetal environment? *J. Intern. Med.* **261**: 453–

460 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2007.01801.x>

Pinheiro H, Gaspar R, Baptista FI, Fontes-Ribeiro CA, Ambrósio AF & Gomes CA (2018) Adenosine A2A Receptor Blockade Modulates Glucocorticoid-Induced Morphological Alterations in Axons, But Not in Dendrites, of Hippocampal Neurons. *Front. Pharmacol.* **9**: 1–11 Available at:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00219/full>

Pinheiro M (2017) Glucocorticoid effects in the developing hippocampus: a morphometric approach.

Ramamoorthy S & Cidlowski JA (2013) Ligand-Induced Repression of the Glucocorticoid Receptor Gene Is Mediated by an NCoR1 Repression Complex Formed by Long-Range Chromatin Interactions with Intragenic Glucocorticoid Response Elements. *Mol. Cell. Biol.* **33**: 1711–1722 Available at:

<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01151-12>

Rayburn WF, Christensen HD & Gonzalez CL (1997) A placebo-controlled comparison between betamethasone and dexamethasone for fetal maturation: Differences in neurobehavioral development of mice offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176**: 842–851 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937897706094>

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ & Hol EM (2016) The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front. Hum. Neurosci.* **10**: 1–28 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2016.00566/full>

Reul J (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression.

*Curr. Opin. Pharmacol.* **2**: 23–33 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489201001175>

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ & Minor L (2004)

Cell Viability Assays Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553881>

Roberts D, Sr D, Roberts D & Dalziel SR (2013) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth ( Review ). *Cochrane Libr.*

Roque S, Oliveira TG, Nobrega C, Barreira-Silva P, Nunes-Alves C, Sousa N, Palha JA & Correia-Neves M (2011) Interplay between Depressive-Like Behavior and the Immune System in an Animal Model of Prenatal Dexamethasone Administration.

*Front. Behav. Neurosci.* **5**: 1–8 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2011.00004/abstract>

Saigal S & Doyle LW (2008) An overview of mortality and sequelae of preterm birth from

- infancy to adulthood. *Lancet* **371**: 261–269 Available at:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673608601361>
- Samtani MN (2005) Betamethasone pharmacokinetics after two prodrug formulation in sheep: implications for antenatal corticosteroid use. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 1124–1130 Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/dmd.105.004309>
- Santiago AR, Baptista FI, Santos PF, Cristóvão G, Ambrósio AF, Cunha RA & Gomes CA (2014) Role of Microglia Adenosine A 2A Receptors in Retinal and Brain Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm.* **2014**: 1–13 Available at:  
<http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/465694/>
- Sapolsky RM (2000) How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr. Rev.* **21**: 55–89 Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Saraiva M & O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 170–181 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711>
- Schafer DP & Stevens B (2015) Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**: a020545 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105435890860887X>
- Seckl JR & Meaney MJ (2004) Glucocorticoid Programming. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1032**: 63–84 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1364.027>
- Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M & Kettenmann H (2016) The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* **64**: 1801–1840 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/glia.23046>
- Sierra A, Gottfried-blackmore A, Milner TA, Ewen BSMC & Bulloch K (2008) Steroid Hormone Receptor Expression and Function in Microglia. **674**: 659–674 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/glia.20644>
- Ślusarczyk J, Trojan E, Głombik K, Budziszewska B, Kubera M, Lasoń W, Popiołek-Barczyk K, Mika J, Wędzony K & Basta-Kaim A (2015) Prenatal stress is a vulnerability factor for altered morphology and biological activity of microglia cells. *Front. Cell. Neurosci.* **9**: 1–14 Available at:  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00082/abstract>
- Smith ME (2001) Phagocytic properties of microglia in vitro: Implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc. Res. Tech.* **54**: 81–94 Available at:

## *Bibliografía*

---

<http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.1123>

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85 Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785904427>

Smoak KA & Cidlowski JA (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 697–706 Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637404001617>

Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD & Sapolsky RM (2009) The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. *Neuron* **64**: 33–39 Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.032>

Sorrells SF & Sapolsky RM (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain. Behav. Immun.* **21**: 259–272 Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915910600359X>

Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ & Vauzour D (2012) Neuroinflammation:

Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol. Aspects Med.* **33**: 83–97

Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.016>

Stephan AH, Barres BA & Stevens B (2012) The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease. *Annu. Rev. Neurosci.*

**35**: 369–389 Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>

Stephens MAC & Wand G (2012) Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res.* **34**: 468–83 Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3860380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW & Villanueva Á (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* **114**: 785–796 Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128112000190>

Ströhle A & Holsboer F (2003) Stress Responsive Neurohormones in Depression and Anxiety. *Pharmacopsychiatry* **36**: 207–214 Available at: <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2003-45132>

Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG & Gibb W (2006) Expression of the

- Multidrug Resistance P-Glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the Human Placenta Decreases with Advancing Gestation. *Placenta* **27**: 602–609 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014340040500158X>
- Svec F & Rudis M (1981) Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in the AtT-20 cell. *J. Biol. Chem.* **256**: 5984–7 Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-109-6-1975>
- Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M & Maeda N (1997) Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: The two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* **20**: 23–37 Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199705\)20:1%3C23::AID-GLIA3%3E3.0.CO;2-6](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/(SICI)1098-1136(199705)20:1%3C23::AID-GLIA3%3E3.0.CO;2-6)
- Tang Y & Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **53**: 1181–1194 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tegethoff M, Pryce C & Meinschmidt G (2009) Effects of Intrauterine Exposure to Synthetic Glucocorticoids on Fetal, Newborn, and Infant Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Humans: A Systematic Review. *Endocr. Rev.* **30**: 753–789 Available at: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2008-0014>
- Toricelli M, Novembri R, Bloise E, De Bonis M, Challis JR & Petraglia F (2011) Changes in Placental CRH, Urocortins, and CRH-Receptor mRNA Expression Associated with Preterm Delivery and Chorioamnionitis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**: 534–540 Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2010-1740>
- Tremblay M-È, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V & Sierra A (2015) From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* **9**: 1–10 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2015.00045/abstract>
- Vreugdenhil E, Verissimo CSL, Mariman R, Kamphorst JT, Barbosa JS, Zweers T, Champagne DL, Schouten T, Meijer OC, Ron de Kloet E & Fitzsimons CP (2009) MicroRNA 18 and 124a Down-Regulate the Glucocorticoid Receptor: Implications for Glucocorticoid Responsiveness in the Brain. *Endocrinology* **150**: 2220–2228 Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2008-1335>
- Waffarn F & Davis EP (2012) Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-



## Bibliografia

---

- pituitary-adrenocortical axis of the fetus and newborn: experimental findings and clinical considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **207**: 446–454 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723873>
- Walker JM (1994) The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In *Basic Protein and Peptide Protocols* pp 5–8. New Jersey: Humana Press Available at: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-169-8:11>
- Wallace AD & Cidlowski JA (2001) Proteasome-mediated Glucocorticoid Receptor Degradation Restricts Transcriptional Signaling by Glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **276**: 42714–42721 Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M106033200>
- Wiechelmann KJ, Braun RD & Fitzpatrick JD (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**: 231–237 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269788903831>
- Wolf SA, Boddeke HWGM & Kettenmann H (2017) Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **79**: 619–643 Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wolf Y, Yona S, Kim K-W & Jung S (2013) Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front. Cell. Neurosci.* **7**: 1–9 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00026/abstract>
- Wong R (2013) Progesterone as a neuroprotectant in stroke.
- Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B & Rao Z (2004) 3D structure of human FK506-binding protein 52: Implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 8348–8353 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC420397>
- Yang P-C & Mahmood T (2012) Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**: 429 Available at: <http://www.najms.org/text.asp?2012/4/9/429/100998>
- Yao J & Johnson RW (1997) Induction of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) in murine microglia by lipopolysaccharide. *Mol. Brain Res.* **51**: 170–178 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169328X97002350>
- Yates CR, Chang C, Kearbey JD, Yasuda K, Schuetz EG, Miller DD, Dalton JT & Swaan

PW (2003) Structural Determinants of P-Glycoprotein-Mediated Transport of Glucocorticoids. *Pharm. Res.* **20**: 1794–1803 Available at: <http://link.springer.com/10.1023/B:PHAM.0000003377.39548.f6>

Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D & Gross CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat. Neurosci.* **17**: 400–406 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3641>