



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

BALBINO LINO DOS SANTOS

**EFEITO DO FLAVONOIDE AGATISFLAVONA NA
MODULAÇÃO DO NLRP3-INFLAMOSSOMA, MICRO-
RNAs E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS
ASSOCIADOS A RESPOSTA MICROGLIAL A
ESTIMULOS INFLAMATORIOS E PEPTÍDEOS A β -
AMILOIDE**

Salvador, BA

2023

BALBINO LINO DOS SANTOS

**EFEITO DO FLAVONOIDE AGATISFLAVONA NA
MODULAÇÃO DO NLRP3-INFLAMOSSOMA, MICRO-
RNAs E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS
ASSOCIADOS A RESPOSTA MICROGLIAL A
ESTIMULOS INFLAMATORIOS E PEPTÍDEOS A β -
AMILOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Lima Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva

Salvador, Ba

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237 Santos, Balbino Lino dos

Efeito do flavonóide agathisflavona na modulação do NRLP3 -
inflamossoma, micro-RNAs e citocinas pró-inflamatórias associados a
resposta microglial a estímulos inflamatórios e peptídeos A β - amiloide/
/Balbino Lino dos Santos. – Salvador, 2023.

119 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Lima Costa; Coorientador: Prof.

Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva.

À minha linda e amada filha
Ângela Elizabeth Andrade Lino.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha imensa gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização desta tese de doutorado. Nesta jornada de descobertas e desafios, recebi apoio e incentivo de várias pessoas e entidades, e é com profunda gratidão que dedico este texto a elas.

Em primeiro lugar, desejo expressar minha gratidão a Deus, que me guiou e me deu força durante toda essa jornada. Sua presença constante em minha vida foi uma fonte de inspiração e motivação, permitindo-me superar obstáculos e alcançar este importante marco acadêmico.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Lima Costa, meu mais sincero agradecimento. Sua orientação sábia e expertise no campo da neuroquímica foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Sua dedicação, paciência e encorajamento constante foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular. Esta nossa equipe e família foi uma fonte constante de apoio, colaboração e camaradagem. Juntos, enfrentamos desafios, compartilhamos conhecimento e aprendemos uns com os outros. Sou grato pela amizade e pela atmosfera colaborativa que tornou minha jornada de pesquisa ainda mais enriquecedora.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às fontes de financiamento que tornaram este projeto possível. Agradeço a CAPES e ao CNPq por acreditarem na importância desta pesquisa e fornecer os recursos necessários para seu desenvolvimento. Sua generosidade e investimento no avanço científico são inestimáveis.

Por último, mas certamente não menos importante, gostaria de agradecer minha família. A minha mãe, minha filha, meu irmão, minha esposa e demais familiares, meu agradecimento mais sincero. Seu amor, apoio e compreensão ao longo desses anos foram fundamentais para a minha perseverança. Suas palavras de encorajamento e presença constante foram meu porto seguro. Dedico este trabalho a vocês, pois sem o apoio da minha família, nada disso seria possível.

RESUMO

A ativação microglial desempenha papel crucial na patogenia de doenças neurodegenerativas (NDD), e o controle desta ativação têm sido alvo de investigações como estratégia ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para NDD. A agatisflavona, purificada de *Cenostigma pyramidale* (Tul.), demonstrou ser neuroprotetora em modelos *in vitro* de excitotoxicidade induzida por glutamato e danos inflamatórios. No entanto, o papel potencial da regulação microglial por agathisflavona nesses efeitos neuroprotetores ainda não está claro. Neste trabalho, nós investigamos em células microgliais do córtex de ratos e em células microgliais de linhagem humana induzidas ao dano inflamatório, os efeitos da agathisflavona em modular a resposta inflamatória com vistas a elucidar mecanismos de neuroproteção. Para isto, culturas de microglias humanas da linhagem C20 e microglias isoladas do córtex de ratos Wistar recém-nascidos foram expostas a oligômeros do peptídeo β -amilóide (500nM) por 4h ou a lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 1 μ g/mL) por 24h e então tratadas ou não com agathisflavona (1 μ M) por 24h. Culturas de células neuronais PC12 foram expostas ao meio condicionado da microglia de rato (MCM) tratado ou não com agathisflavona. Em um primeiro trabalho, observamos que o LPS induziu a microglia a assumir um estado inflamatório ativado (CD68 aumentado, com fenótipo mais arredondado/amoebóide). No entanto, a maioria das microglias expostas ao LPS e agathisflavona apresentaram um perfil anti-inflamatório (CD206 aumentado e fenótipo ramificado), associado à redução da expressão de NO, GSH, inflamassoma NLRP3, IL1- β , IL-6, IL-18, TNF, CCL5 e CCL2. O docking molecular também mostrou que a agathisflavona se ligou ao domínio inibitório NLRP3 NACTH. Além disso, nas culturas de células PC12 expostas ao MCM previamente tratado com o flavonoide, a maioria das células preservaram os seus neuritos e aumentaram a expressão de β -tubulina III. No segundo trabalho, observamos que o β -amilóide e o LPS induziram as culturas de microglia a assumir um estado inflamatório ativado, com aumento na expressão de miR-146a e miR-155 e dos mediadores inflamatórios IL1- β , IL-6 e NOS2. No entanto, nas células expostas ao dano inflamatório e tratadas com agathisflavona, observamos redução significativa na concentração de miR146a e miR-155, bem como das citocinas inflamatórias avaliadas. Observamos também nas células estimuladas apenas com β -amilóide, um aumento na relação das proteínas sinalizadoras p-STAT3/STAT3, e nas células estimuladas com β -amilóide e tratadas com flavonoide, redução nesta relação. Além disso, mostramos que agathisflavona regulou negativamente a concentração microglial de cálcio citosólico, sugerindo seu efeito antagonista em receptor purinérgico. Assim, estes dados reforçam a atividade anti-inflamatória e o efeito neuroprotetor da agathisflavona, associados ao controle do inflamassoma NLRP3 e de mediadores inflamatórios, com destaque também ao seu potencial na regulação de miRNAs associados a neuroinflamação. Estes resultados fortalecem o potencial deste flavonoide como uma molécula promissora ao tratamento ou a prevenção de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: flavonoides, agathisflavona, microglia, neuroinflamação, miRNAs.

ABSTRACT

Microglial activation plays a crucial role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (NDD), and the control of this activation has been the subject of investigations as a strategy for the development of new therapeutic approaches for NDD. Agathisflavone, purified from *Cenostigma pyramidale* (Tul.), has been shown to be neuroprotective in *in vitro* models of glutamate-induced excitotoxicity and inflammatory damage. However, the potential role of microglial regulation by agathisflavone in these neuroprotective effects remains unclear. In this work, we investigated in microglial cells from the cortex of rats and in microglial cells of human lineage induced to inflammatory damage, the effects of agathisflavone in modulating the inflammatory response in order to elucidate mechanisms of neuroprotection. For this purpose, cultures of human microglia of the C20 lineage and microglia isolated from the cortex of newborn Wistar rats were exposed to β -amyloid peptide oligomers (500nM) for 4h or *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL) for 24h and then treated or not with agathisflavone (1 μ M) for 24h. Cultures of PC12 neuronal cells were exposed to rat microglia conditioned medium (MCM) treated or not with agathisflavone. In a first study, we observed that LPS induced microglia to assume an activated inflammatory state (increased CD68, with a more rounded/amoeboid phenotype). However, most microglia exposed to LPS and agathisflavone showed an anti-inflammatory profile (increased CD206 and branched phenotype), associated with reduced expression of NO, GSH, NLRP3 inflammasome, IL1- β , IL-6, IL-18, TNF, CCL5 and CCL2. Molecular docking also showed that agathisflavone bound to the NLRP3 NACTH inhibitory domain. Furthermore, in cultures of PC12 cells exposed to MCM previously treated with the flavonoid, most cells preserved their neurites and increased expression of β -tubulin III. In the second study, we observed that β -amyloid and LPS induced microglia cultures to assume an activated inflammatory state, with increased expression of miR-146a and miR-155 and inflammatory mediators IL1- β , IL-6 and NOS2. However, in cells exposed to inflammatory damage and treated with agathisflavone, we observed a significant reduction in the concentration of miR146a and miR-155, as well as the inflammatory cytokines evaluated. We also observed in cells stimulated only with β -amyloid, an increase in the ratio of p-STAT3/STAT3 signaling proteins, and in cells stimulated with β -amyloid and treated with flavonoid, a reduction in this ratio. Furthermore, we showed that agathisflavone downregulated microglial cytosolic calcium concentration, suggesting its antagonistic effect on purinergic receptor. Thus, these data reinforce the anti-inflammatory activity and the neuroprotective effect of agathisflavone, associated with the control of the NLRP3 inflammasome and inflammatory mediators, also highlighting its potential in the regulation of miRNAs associated with neuroinflammation. These results strengthen the potential of this flavonoid as a promising molecule for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

Keywords: flavonoids, agathisflavone, microglia, neuroinflammation, miRNAs.

LISTA DE FIGURAS

- REVISÃO DE LITERATURA:

Figura 1. Equilíbrio do SNC e a neuroinflamação.	17
Figura 2. Estrutura química geral dos flavonoides e estrutura química do flavonoide agathisflavona.	33

- Capítulo I - Artigo Científico 1:

Figure 1. Effects of agathisflavone on LPS-treated microglia.....	48
Figure 2. Effects of agathisflavone on Iba-1 expression in LPS-treated microglia.	49
Figure 3. Effects of agathisflavone on CD68 expression in LPS-treated microglia.	50
Figure 4. Effects of agathisflavone on CD206 expression in LPS-treated microglia.	51
Figure 5. Effects of agathisflavone on GSH depletion and NO production in LPS-treated microglia.	53
Figure 6. Effects of agathisflavone on inflammatory genes in LPS-treated microglia.	55
Figure 7. Agathisflavone and MCC950 interactions with the NACTH domain of NLRP3 inflammasome of <i>Rattus norvegicus</i>	57
Figure 8. Agathisflavone and MCC950 interactions with the NACTH domain of NLRP3 inflammasome of <i>Homo sapiens</i>	59
Figure 9. Agathisflavone has a neuroprotective effect on LPS-treated cells.	62

- Capítulo II - Artigo Científico 2:

Figure 1. Effects of agathisflavone on human microglia treated with β -amyloid or LPS.	86
Figure 2. Effects of agathisflavone on microRNAs (miRNAs) of human microglia treated with β -amyloid or LPS.	88
Figure 3. Effects of agathisflavone on inflammatory genes in β -amyloid-treated microglia.	90

Figure 4. Effects of agatisflavone on the STAT-3/pSTAT-3 signaling pathway in human microglia treated with β -amyloid.	91
Figure 5. Effects of agatisflavone on the pathway and mobilization of Ca ²⁺ ions.	92

SÍNTESE CONCLUSIVA:

FIGURA 3. Inibição de vias inflamatórias por agatisflavona em células microgliais.	106
--	-----

LISTA DE TABELAS

Table 1. Comparison of amino acids and types of interactions of NLRP3-agathisflavone and NLRP3-MCC950 binding (NLRP3 <i>Rattus norvegicus</i>).	58
Table 2. Comparison of amino acids and types of interactions of NLRP3-agathisflavone and NLRP3-MCC950 binding (NLRP3 <i>Homo sapiens</i>).	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Trifosfato de adenosina

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)

BBB ou BHE: Barreira hemato-encefálica (do inglês *blood-brain barrier*).

BSO: Butionina Sulfoxamina

C20: Linhagem de células de micróglia humana

CAT: Catalase

CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2

CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5

CD 206: Anticorpo macrófagos M2A

CD68: Anticorpo macrófagos M1

CO₂: Dióxido de carbono

DA: Doença de Alzheimer

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNAc: DNA complementar

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FITC: Isotiocinato de fluoresceína

GPx: Glutation Peroxidase

GR: Glutation Redutase

GSH: Glutation reduzido

GSSG: Glutation oxidado

GST: Glutation S-transferase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HPRT1: Hipoxantina-guanina fosfo-ribosil transferase (do inglês *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*)

Iba-1: Anticorpo estrutural para microglia

ICQ: Imunocitoquímica.

LPS: Lipopolissacarídeo.

MCB: Monoclorobimano

miRNA: micro RNAs

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*).

MRP: Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (do inglês *Multi-drug resistance protein*)

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NF-κB: Factor nuclear kappa B

NGF: Fator de crescimento do Nervo

NO: Óxido nítrico

O₂: Radical superóxido

OH•: Radical hidroxil

PBS: Tampão fosfato de sódio (do inglês Phosphate buffered saline)

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SDS: Duodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

SNC: Sistema nervoso central

SOD: Superóxido dismutase

STAT-3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (do inglês *signal transducer and transcription 3*).

TBS: Tampão tris salino.

TBS-T: Tampão tris salino com Tween 20.

TGF-β: Fator de crescimento e transformação beta (do inglês *Transforming Growth Factor*).

TLR: Receptor tipo toll (do ingles *Toll like receptor*)

TNF: Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis factor*).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	166
2.1 NEUROINFLAMAÇÃO: ENVOLVIMENTO DA NEUROGLIA E ASPECTOS GERAIS	16
2.2. NEURODEGENERAÇÃO: CARACTERÍSTICAS E RESPOSTA IMUNE..	18
2.2.1. Microglia: aspectos morfofuncionais e papel na resposta imune na neurodegeneração	20
2.2.2. Papel dos Micro-RNAs na resposta microglial	24
2.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	26
2.3.1 Causas, fisiopatologia e características da resposta imune	26
2.3.2 Abordagens terapêuticas na Doença de Alzheimer	29
2.4. FLAVONOIDES: POTENCIAL FARMACOLÓGICO E NEUROPROTETOR NO SNC	32
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO I	37
4.1 Introduction	38
4.2 Materials and Methods	39
4.3 Results	46
4.4 Discussion and conclusion	63
4.5 References	71
5. CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO II	76
5.1 Introdução	77
5.2 Material e métodos.....	78
5.3 Resultados	85
5.4 Discussão.....	93
5.5 Conclusão	98
5.6 Referências	99
6. CONCLUSÕES GERAIS	105

6.1 Figura 3. Síntese conclusiva: Inibição de vias inflamatórias por agatisflavona em células microgliais	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	107

1. INTRODUÇÃO GERAL

A doenças demenciais afetam hoje mais de 25 milhões de pessoas no mundo, onde cerca de até 75% de todos esses casos são causados pela doença de Alzheimer (QIU, KIVIPERTO AND VON STRAUSS, 2019). Só no Brasil, em 2008, a prevalência de demência chegou a 5,1% em idosos pobres com mais de 65 anos de idade (SCAZUFCA, *et al.*, 2008). A doença de Alzheimer (DA), é uma desordem neurodegenerativa incurável, caracterizada pelo acúmulo de oligômeros ou de fibras insolúveis da proteína β -amilóide ($A\beta$) no parênquima cerebral e formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares da proteína Tau, que promovem a ativação glial com consequente resposta inflamatória e perda de neurônios colinérgicos (ALHAZMI & ALBRATY, 2022). Esta resposta inflamatória é mediada por microglia e astrócitos, que uma vez ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , IL-6, TNF- α , entre outras, favorecendo a neurodegeneração. Isso leva progressivamente a um declínio cognitivo, perda gradual de memória e de outras funções da vida diária. Neste processo neuroinflamatório, além do envolvimento de mediadores da inflamação, há também a participação do complexo protéico inflamossoma NLRP3, promovendo ativação de mediadores inflamatórios, e da proteína de alta mobilidade grupo 1 (HMGB1) que medeia neuroinflamação em cérebro envelhecido, representado um importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão da DA. Trabalhos recentes também têm demonstrado que a presença de microRNAs (miRs), tais como o miR-146a e o miR-155, tem sido encontrados em resposta mediada por microglia e encontrados também no líquido cefalorraquidiano humano (LCR) e em fluido extracelular derivado de tecido cerebral de pacientes com DA. Além disso, foi mostrado em modelos de DA o envolvimento de proteínas da via de sinalização JAK2/STAT3, localizadas no hipocampo, na patogênese da doença (ABUBAKAR *et al.* 2022; SU, *et al.* 2016; SABA *et al.* 2012; DOURADO *et al.*, 2020; WOLF, *et al.*, 2017; MEDRANO-JIMÉNEZ, *et al.*, 2022).

Atualmente, os inibidores da acetilcolinesterase (donepezil, galantamina e rivastigmina) e os antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina) são escolhas farmacológicas utilizadas na conduta terapêutica para

a doença de Alzheimer (DA), embora estes fármacos não retardem a progressão da doença. Além disso, estudos têm avaliado a imunoterapia para a DA, a partir do uso de anticorpos monoclonais contra β -amilóide, como o aducanumab, embora ainda permaneçam obscuras as evidências da eficácia clínica e a presença de riscos adversos graves (SIMS, *et al.*, 2023; WIDERA, BRANGMAN AND CHIN, 2023). Uma alternativa que vem apresentando potencial promissor são os flavonoides, para os quais já existem inúmeros relatos evidenciando seus efeitos benéficos na memória, cognição e na redução da neurodegeneração, indicando seu potencial em proteger os neurônios contra lesões induzidas pelos processos neuroinflamatórios (DO NASCIMENTO, *et al.*, 2022; MEDRANO-JIMÉNEZ *et al.*, 2022; PANCHE *et al.*, 2016; PARKER *et al.*, 2009). Em trabalho realizado por DE ALMEIDA *et al.* (2020a), no qual foi avaliado o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório do flavonoide agatisflavona em modelos *in vitro* de neuroinflamação induzida por LPS, observou-se através de marcação com Fluoro Jade B e caspase 3, que a agatisflavona não foi neurotóxica e apresentou efeito neuroprotetor frente ao dano inflamatório. Análises anteriores revelaram também que a agatisflavona reduziu a ativação inflamatória e proliferação microglial, através da redução do marcador CD68, assim como favoreceu a preservação da integridade de neurônios e astrócitos, determinado pelos marcadores β tubulina III e GFAP, respectivamente. Neste sentido, os achados apresentados sugerem as propriedades neuroprotetoras e antiinflamatórias promovidas por flavonoides, com destaque para a agatisflavona, em modelos *in vitro*. Contudo, apesar dos resultados supracitados, novos estudos ainda precisam ser conduzidos a fim de confirmar, em diferentes modelos, o potencial da agatisflavona no tratamento de desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEUROINFLAMAÇÃO: ENVOLVIMENTO DA NEUROGLIA E ASPECTOS GERAIS

As células da glia ou neuroglia, correspondem a uma ampla população de células heterogêneas, mas que contribuem para a estruturação do sistema nervoso (SN), sendo encontradas nos sistemas nervoso central (SNC), nervoso periférico (SNP), nervoso entérico ou autônomo. Elas indiscutivelmente, representam cerca de metade do volume do cérebro humano. A proporção entre glia e neurônios também varia entre as diferentes regiões de um cérebro, e estudos têm mostrado que o número total de células neuronais e não neuronais no cérebro humano está mais ou menos no mesmo nível, na faixa dos 80 a 100 bilhões de células. No SNC as células da neuroglia apresentam diferentes tipos morfológicos, sendo subdivididas em dois grupos: microglia (de origem mesodérmica) e macroglia (de origem ectodérmica). A microglia corresponde a uma população única de células, enquanto a macroglia compreendem os oligodendrócitos, astrócitos e células NG2. Estas células, apesar de apresentarem diferentes origens embriológicas e diferentes propriedades funcionais específicas, elas apresentam uma função comum a todas, que é a de manter o equilíbrio, a homeostasia do SNC (Figura 1A). A íntima interação entre a neuroglia e os neurônios, além de ser crucial durante o desenvolvimento do SNC, contribui também para a neuroproteção. A homeostasia compreende a manutenção da comunicação intercelular, o equilíbrio metabólico, molecular, morfológico, imunológico e a interação entre sistemas, como a que ocorre entre a glia entérica e o SNC, contribuindo desta maneira na regulação de respostas fisiológicas sistêmicas. Eventos que perturbem este equilíbrio promovem alterações fisiológicas no SNC, contribuindo para o desenvolvimento de processos neuroinflamatórios, que por sua vez levam a disfunção e/ou morte neuronal (VERKHRATSKY, *et al.*, 2019; VERKHRATSKY & BUTT, 2013; LENT, 2005).

A neuroinflamação é a resposta do SNC a componentes reativos e/ou lesivos que promovem alterações na homeostasia deste sistema, independentemente de a causa ser endógena ou exógena. As doenças

neurológicas, sejam elas traumáticas, neoplásicas, isquêmicas, metabólicas, tóxicas, infecciosas, autoimunes ou degenerativas, desencadeiam o processo neuroinflamatório, contribuindo na ativação da resposta imunológica. Estas variadas patologias neurológicas que se associam a danos neuroinflamatórios apresentam importante impacto no aumento da morbidade e da mortalidade. Neste processo inflamatório do SNC, há a participação e a responsividade das células deste sistema, que são ativadas e recrutadas em resposta aos mediadores inflamatórios (Figura 1B). A ativação das células da glia, também chamado de gliose, contribui para aumento da síntese e secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, bem como para ativação de células do endotélio vascular, com conseqüente aumento na liberação dos mediadores óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGS). Além disso, as células imunes periféricas também podem ser recrutadas e se infiltrar no parênquima cerebral, contribuindo com a resposta inflamatória local (Figura 1C). Nesta resposta celular ao dano lesivo no SNC, vale destacar que um importante fator determinante da inflamação cerebral é o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Na neuroinflamação, há uma ruptura neste equilíbrio com prevalência dos mediadores pró-inflamatório (KÖLLIKER-FRERS *et al.*, 2021).

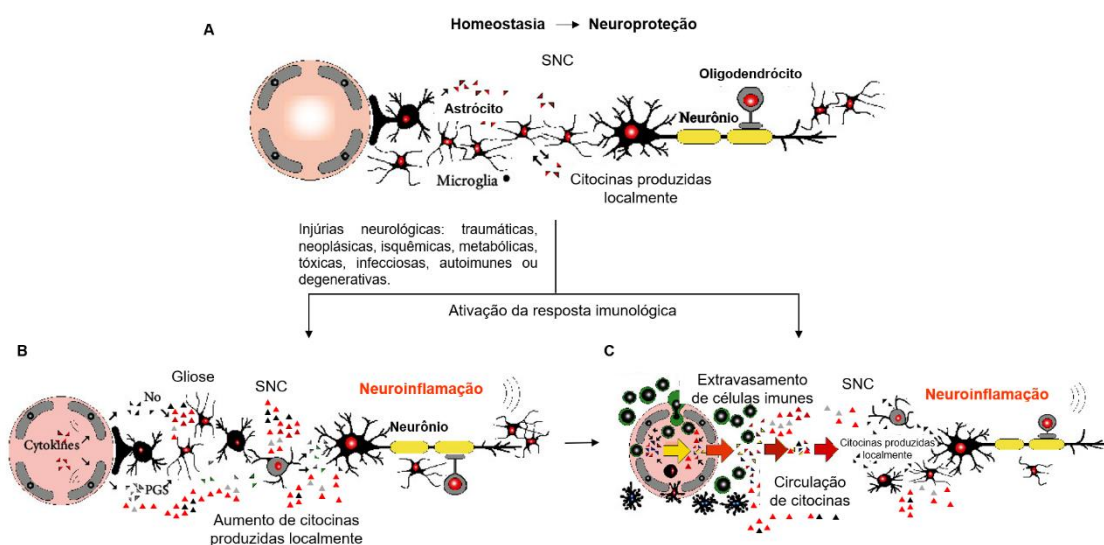


Figura 1. Equilíbrio do SNC e a neuroinflamação. (A) Gliócitos e neurônios em homeostasia no SNC. (B) Eventos após injúria do SNC: ativação glial (gliose)

com aumento na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios; ativação de células endoteliais dos capilares sanguíneos e aumento na liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGS). (C) Aumento da circulação de citocinas periféricas, diminuição da seletividade da barreira hematoencefálica (BBB) e extravasamento de células imunológicas da circulação periférica. (Adaptado de Kölliker-Frers *et al.*, 2021).

Dentre estas células do SNC, já tem sido mostrado que microglia e os astrócitos são capazes de responder a injúrias que afetam o sistema nervoso e que causam danos aos neurônios. Esta resposta, muitas vezes compreendem alterações em suas morfologias e modificações nos padrões de expressão de moléculas sinalizadoras e fatores neurotróficos e/ou neurotóxicos, ou ainda, a associação desses dois fenômenos, estado este conhecido por microgliose para a microglia reativa, e astrogliose para astrócitos reativos. Microglia e astrócitos também interagem entre si e com neurônios e podem modular suas atividades funcionais, além de contribuírem com a produção de mediadores inflamatórios, contudo, ainda se sabe pouco a respeito das interações entre estas células e sua participação na resposta imune aos processos inflamatórios do SNC (ABUBAKAR *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018; KETTENMANN *et al.*, 2011; ASCHNER, 1999). O conhecimento que se tem é que a inflamação do tecido cerebral juntamente com os mediadores inflamatórios contribui para o estresse oxidativo, promovendo a degeneração e morte dos neurônios. Vários estudos já relataram a inflamação e as respostas imunes das células do SNC como fatores determinantes para a progressão das doenças neurodegenerativas, como o que ocorre na doença de Alzheimer (KÖLLIKER-FRERS *et al.*, 2021; ABUBAKAR *et al.*, 2022; DOURADO *et al.*, 2020).

2.2. NEURODEGENERAÇÃO: CARACTERÍSTICAS E RESPOSTA IMUNE

Distúrbios neurodegenerativos são considerados um grave problema de saúde pública que afeta o envelhecimento populacional. A neurodegeneração está associada à perda de neurônios no cérebro ou medula espinhal. Este distúrbio tem como uma característica comum o envolvimento de diferentes tipos de células do SNC, tipicamente microglia e astrócitos que quando reativos, em

um processo chamado de gliose, contribuem para a disfunção e/ou morte neuronal. Apesar das novas abordagens terapêuticas desenvolvidas ao longo dos últimos anos, os tratamentos contra as desordens neurodegenerativas ainda são limitados e as abordagens convencionais tratam principalmente os sintomas (COSTA *et al.*, 2016; CAPRINDA *et al.*, 2017).

À medida que a população em geral envelhece progressivamente, a prevalência de distúrbios neurodegenerativos continua a aumentar. O envelhecimento cerebral é acompanhado de alterações metabólicas, morfológicas e mudanças neurofisiológicas, muitas vezes associadas a uma deficiência na aprendizagem e memória com consequente perda de sinapses (PROCACCINI *et al.*, 2016). Estes distúrbios estão associados à deposição de proteínas agregadas e mal enoveladas, que cursam com alterações cognitivas, disfunção locomotora e perda neuronal. Muitos estudos demonstram que as doenças neurodegenerativas têm um fenótipo inflamatório dominante, e o papel da neuroinflamação é a ativação imune no SNC nos estágios iniciais da doença. Não obstante, a população de macrófagos residentes no SNC, a microglia, é a uma classe de células que está presente de forma ativa em quase todos os distúrbios neurodegenerativos. Além da microglia, astrócitos ativados e monócitos ou linfócitos periféricos podem ser detectados no SNC afetado (DOTY *et al.*, 2015).

A resposta imune no SNC está associada a presença de estressores fisiológicos e celulares, como o envelhecimento, a hipóxia ou proteínas anômalas, que podem estimular e até exacerbar a neuroinflamação pela microglia e incitar o dano neurotóxico. Estímulos inflamatórios em células microgliais, como o LPS ou oligômeros de β -amilóide, induz alterações morfológicas e geração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como contribuem para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que na microglia são geradas principalmente pela ativação de NADPH oxidase-2 (NOX2). Embora a ativação de células microgliais seja uma resposta importante contra praticamente todos os insultos do SNC, a ativação crônica da microglia, como ocorre em praticamente todas as doenças neurodegenerativas, poderia eventualmente levar a lesões neuronais devido à produção persistente de mediadores inflamatórios tóxicos como citocinas, espécies reativas de

oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (SIMPSON & OLIVER, 2020; DOURADO *et al.*, 2020; DOTY *et al.*, 2015; VAN HORSSSEN *et al.*, 2019).

2.2.1. Microglia: aspectos morfofuncionais e papel na resposta imune e neurodegeneração

A microglia são células imunocompetentes localizadas no sistema nervoso central (SNC) e correspondem a cerca de 5 a 10% das células do cérebro, contribuindo para a proteção e manutenção da função normal do SNC. Elas são células gliais mesodérmicas oriundas do saco vitelino, que invadem e migram para o parênquima cerebral no início do seu desenvolvimento embrionário, e mudam suas características morfológicas, assumindo um aspecto altamente ramificado, que permite a constante monitoração do microambiente no sistema nervoso. No SNC, a microglia não está distribuída de forma uniforme. Estudos relatam que estas células são encontradas principalmente em nichos neurogênicos, especificamente nas zonas subventricular e subgranular. Tem sido observado também um grande número de microglias no giro denteado do hipocampo, na substância negra e em partes dos gânglios da base. A proporção microglial varia de 5% no córtex e corpo caloso a 12% na substância negra. Tem sido referido também microglias com diferentes tamanhos e padrões de ramificação nas diferentes camadas histológicas do córtex cerebelar (WEY & LI, 2022).

Estas células têm vida relativamente longa e compartilham muitas propriedades que são semelhantes a macrófagos encontrados em outros tipos de tecidos, incluindo a fagocitose, apresentação de antígenos, síntese e expressão de mediadores inflamatórios, indução à inflamação e eliminação de moléculas e agentes estranhos ao SNC, constituindo desta maneira, a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos e outros danos no SNC (ALOISI, 2001; NIMMERJAHN *et al.*, 2005; MARÍN-TEVA *et al.*, 2012; THION & GAREL, 2020). Essas células podem suprimir a inflamação através do aumento da expressão de citocinas regulatórias como interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), além de contribuir para neurogênese, através da produção de fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1),

capaz de inibir a apoptose e aumentar a proliferação e diferenciação de células tronco neurais (ALOISI, 2001; THION & GAREL, 2020; NAYAK *et al.*, 2014; VILHARDT, 2005; WAKE *et al.*, 2011). Além da função de proteção imunológica, a microglia também desempenha importante papel na manutenção, reciclagem e renovação de outras células gliais e estruturas, a partir de sua ação fagocítica no cérebro, eliminando células inteiras ou subestruturas celulares, especialmente sinapses, por exemplo. Elas também participam no processo de neurogênese, com destaque às células microgliais encontradas na região da zona subgranular (SGZ) do giro denteado no hipocampo de cérebros adultos, através da liberação de fatores solúveis que estimulam e direcionam diferenciação das células tronco neuronais (ROCK, *et al.* 2004; NIMMERJAHN *et al.*, 2005; PAOLICELLI *et al.*, 2011; ARAKI *et al.*, 2021).

Em relação ao seu aspecto morfológico, a microglia pode assumir a forma ramificada, se estiver em repouso ou morfologia ameboide quando em estado ativado. Na forma ramificada, ou seja, quando a microglia se encontra em um estado de repouso e não ativada, ela desempenhando a função de vigilância do parênquima cerebral e manutenção da homeostasia tecidual. Contudo, estas células podem se tornar responsivas na presença de estímulos danosos, passando assim, a assumir a forma ameboide e reativa. Na forma ameboide, as células estão ativas e responsivas aos estímulos lesivos, e contribuem também na ativação de outras células presentes no microambiente cerebral. Por exemplo, em resposta a uma variedade de insultos como infecção, lesão traumática ou isquemia, a microglia é ativada no parênquima cerebral, e responde assumindo uma forma amebóide e movendo-se para o local em que se concentra o estímulo e/ou lesão tecidual, e lá, fagocitando partículas, sintetizando e secretando mediadores que irão contribuir na ativação de outros grupos de células gliais a participarem da resposta de defesa que se desenvolve no microambiente. Já é de conhecimento também que microglias ramificadas apresentam variados tipos de receptores de superfície celular, muitos dos quais são expressos de forma constitutiva, e que são regulados por estas células em resposta aos estímulos lesivos responsáveis por sua ativação e mudança morfológica. A regulação destes receptores está muitas vezes associada ao perfil de ativação microglial, se refletindo também no perfil de mediadores

químicos que serão expressos e secretados no microambiente tecidual (ROCK, *et al.*, 2004).

Dentre estes receptores, merece destaque os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), expressos na superfície celular. Estes PRRs reconhecem e são ativados por moléculas exógenas ou endógenas, associadas a neurodegeneração, como oligômeros de β -amilóide ($A\beta$), α -sinucleína, entre outras. Esta ativação microglial através destes receptores promovem a liberação sustentada de mediadores neuroinflamatórios que irão levar a morte celular, contribuindo para a neurodegeneração e progressão da doença (WOLF *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2016). Dentre os receptores de reconhecimento de padrões, podemos destacar aqui os inflamossomas, que constituem grandes complexos proteicos constituídos por uma molécula sensora pertencente à família dos receptores semelhantes a NOD (NLR) ou uma proteína contendo o domínio pirina, a proteína adaptadora ASC e a caspase 1. Nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, o inflamossoma NLRP3 têm merecido destaque, devido sua capacidade de detectar oligômeros de β -amiloide. Este reconhecimento ativa a caspase-1 do NLRP3 a cliva citocinas pró-inflamatórias da família das interleucinas-1 β (IL-1 β) e IL-18, o que leva à liberação dessas citocinas e progressão do processo neuroinflamatório (HENEKA *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Em eventos patológicos, a microglia é ativada por qualquer tipo de estímulo que promova alteração na homeostase cerebral. Esse processo de ativação, conhecido como microgliose, é altamente diversificado e depende do contexto e do tipo de agente estressor ou patologia. A microglia pode influenciar fortemente o resultado patológico ou a resposta a um estressor devido à liberação de uma infinidade de substâncias, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ROCK, *et al.*, 2004; WOLF *et al.*, 2017;). Esta célula têm sido implicadas nos mecanismos de patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, e na demência associada à AIDS (DICKSON *et al.*, 1993; ARAKI *et al.*, 2021).

Na neurodegeneração, as células microgliais inflamatórias contribuem para uma neurogênese anormal, a partir de seus mediadores pro-inflamatórios liberados no microambiente, prejudicando desta forma a função neurológica normal (ARAKI *et al.*, 2021). Nestes eventos patológicos, ocorre a microgliose, caracterizada por uma mudança no fenótipo morfológico microglial, no qual a célula passa da forma ramificada para uma morfologia mais ameboide. Neste processo de ativação microglial, são postuladas duas formas clássicas, a saber o estado M1 ou pró-inflamatório e o estado M2 ou anti-inflamatório, mais associado ao reparo tissular. Entretanto, este conceito clássico tem sofrido questionamentos pela comunidade científica, devido a dinamicidade do processo de ativação microglial nas variadas situações patológicas e devido a heterogeneidade de propriedades que podem ser adquiridas por estas células quando ativadas (WOLF *et al.*, 2017). Um número crescente de estudos baseados no sequenciamento de material genético microglial ou na análise multiômica têm mostrado que os fenótipos microgliais são altamente heterogêneos e dinâmicos, dependendo da gravidade e do estágio da doença como bem como do microambiente inflamatório específico em que se encontram (LI *et al.*, 2022). Estudos mostram que o perfil de ativação microglial M1 caracteriza-se pelo aumento da expressão do marcador CD68 (glicoproteína transmembranar lisossomal) (BOCHE *et al.*, 2013), produção de mediadores proinflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , EROs, NO e proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2/MCP1) (NAKAGAWA & CHIBA, 2015). Por outro lado, o perfil de ativação alternativa M2 (anti-inflamatório/neuroprotetor) há aumento da expressão do marcador CD206 (receptor de reconhecimento de padrão: receptor manose 1 lectina tipo C), produção de citocinas regulatórias, expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e IGF-1 (NAKAGAWA & CHIBA, 2015). Além disso, no perfil M2 há também aumento da expressão da enzima arginase-1. Sabe-se que os produtos gerados do metabolismo da arginina, contribuem para o reparo tecidual. Ademais, a arginase-1 compete com a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelo mesmo substrato, levando a supressão de NO (LE & TANG, 2016). É importante salientar que o desequilíbrio entre os perfis M1/M2, tem um papel crucial na inflamação no SNC. Embora a glia reativa possa desempenhar um papel protetor no SNC, a ativação sustentada exacerba o dano

neuronal e acelera a progressão de doenças neurodegenerativas (NAKAGAWA & CHIBA, 2015; KEMPURAJ *et al.*, 2016).

A ativação microglial envolve também a participação de receptores purinérgicos. Assim como os macrófagos, a microglia expressa muitos tipos de purinoceptores P2, que podem ser do tipo ionotrópicos (P2X) ou do tipo metabotrópicos (P2Y). Estes receptores purinérgicos, sejam ionotrópicos ou metabotrópicos, além de desempenharem inúmeras funções fisiológicas em microglia e em outras células da glia, estão também associados a ativação microglial e a uma variedade ampla de doenças que comprometem o SNC, dentre elas as neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (INOUE, 2008; WEISMAN *et al.*, 2012). Dentre os receptores metabotrópicos P2Y, os mais importantes são P2Y2, P2Y6, P2Y12 e P2Y13. Uma vez ativados, estes receptores levam ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , contribuindo na regulação da secreção de quimiocinas e de outros mediadores pró-inflamatórios (ANTONIOLI *et al.*, 2019). Estudos tem mostrado que a expressão de receptores P2 e outros componentes da via purinérgica são também reguladas por miRNAs, que são moléculas de RNA não codificantes envolvidas no controle da expressão de gênica, silenciando alvos de mRNA (FERRARI *et al.*, 2016).

2.2.2. Papel dos Micro-RNAs na resposta microglial

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógeno não codificante que apresentam cerca de 20 a 22 nucleotídeos. Estas moléculas surgem como novos alvos nas investigações dos mecanismos regulatórios de inúmeros processos celulares (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022). Estudos têm mostrado que muitos destes miRNAs estão associados a regulação do crescimento, desenvolvimento e regulação de processos celulares como a diferenciação, metástase, proliferação e expressão de proteínas e mediadores da inflamação (ZHANG *et al.*, 2018; WU & WANG, 2020). A biogênese e a função dos miRNAs são rigidamente reguladas por muitos fatores transcricionais e pós-transcricionais. Alterações na regulação destas moléculas em células do SNC, como aquelas que ocorrem na microglia ativada por estímulos lesivos, por

exemplo, contribuem para o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e lesões cerebrais (SU *et al.*, 2016).

No SNC, estudos recentes têm mostrado que tanto as mudanças fenotípicas desenvolvidas pela microglia ativa, quanto o perfil de mediadores inflamatórios expressos são modulados por miRNAs que regulam a expressão de proteínas a partir do silenciamento de mRNA ou degradando transcritos gênicos. Alguns grupos de miRNAs, como miR-424, miR-222 e miR-155, estão envolvidos na diferenciação celular da linhagem monocítica. Estudos tem mostrado que o miR-124, por exemplo, está envolvido na manutenção do estado de repouso da microglia. Em modelos *in vitro*, com microglia sendo submetida a estímulos inflamatórios, foi mostrado uma regulação negativa de miR-124. Por outro lado, tem sido mostrado que os miRNAs miR-21, miR-146a/b e miR-155, estão associados à ativação pró-inflamatória da microglia. O miR-155, por exemplo, tem sido regulado positivamente em resposta a estímulos pró-inflamatórios, sendo associado a regulação da expressão de citocinas inflamatórias como IL-6. O miR-146 demonstrou desempenhar um papel importante na modulação da resposta imune, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e regulando negativamente os mediadores da via de sinalização inflamatória iniciada por NF- κ B em microglia e astrócitos. Estudos tem mostrado que a regulação positiva de miR-146a, promovida por sinais pró-inflamatórios via estimulação do receptor Toll-like 4 (TLR4) e ativação do fator nuclear kappaB (NF- κ B), contribui subsequentemente para supressão transcricional do NF- κ B, servindo desta forma como um mediador de feedback negativo das respostas pró-inflamatórias (LI *et al.*, 2011). Em modelos de camundongos para doença de Alzheimer (DA), tem sido mostrado que o miR-146 tem como alvo várias citocinas pró-inflamatórias (TAGANOV *et al.*, 2006; WOLF, *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2016). Estes aspectos apresentados reforçam que os estados de ativação microglial sofrem influência de diversos fatores presentes no microambiente tecidual e os miRNAs surgem como um desses fatores em potencial, que despertam a curiosidade científica devido a sua capacidade de modular o comportamento da microglia.

2.3. ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

2.3.1. Causas, fisiopatologia e características da resposta imune

A doença de Alzheimer (DA), é a mais frequente desordem neurodegenerativa no mundo, de causa multifatorial, sendo a idade avançada o fator de risco mais forte. Outros fatores também tem sido associados a DA, tais como os fatores psicossociais, a susceptibilidade genética, as exposições ambientais a metais pesados, as infecções e as doenças vasculares (QIU, KIVIPELTO & VON STRAUSS, 2009). Atualmente ainda não existe uma teoria precisa para explicar a patogenia da DA, entretanto algumas hipóteses tem sido elencadas como a colinérgica e a amilóide. Na hipótese colinérgica, acredita-se que a redução de marcadores colinérgicos pré-sinápticos no córtex cerebral, a neurodegeneração grave do núcleo basal de Meynert (NBM) no prosencéfalo basal e os antagonistas colinérgicos sejam responsáveis pelo declínio da memória na DA. Na hipótese amilóide, acredita-se na redução da degradação da proteína β -amilóide pelas enzimas β - e γ -secretase, que pode estar associada a idade avançada ou a condições patológicas, com conseqüente acúmulo de peptídeos $A\beta$, principalmente o $A\beta_{42}$, que induz a formação de fibrilas amilóides $A\beta$, e resultam em neurotoxicidade e neurodegeneração. E neste contexto, muitos trabalhos descrevem que a fisiopatologia na DA é caracterizada pelo acúmulo de oligômeros ou de fibras insolúveis da proteína β -amilóide ($A\beta$) no parênquima cerebral, formação de emaranhados neurofibrilares, ativação glial e conseqüente produção de mediadores inflamatórios como NO e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que eventualmente contribuem para toxicidade neuronal (BREIJYEH & KARAMAN R, 2020; SUTINEN *et al.*, 2012; DOTY *et al.*, 2015).

Essa enfermidade está associada à redução dos níveis de acetilcolina no processo sináptico, que culmina com a diminuição da neurotransmissão colinérgica cortical. As sinapses colinérgicas são particularmente afetadas pela neurotoxicidade dos oligômeros $A\beta$, assim a perda sináptica está associada com o comprometimento cognitivo (LANOISELEE *et al.*, 2017; FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016). Recentemente demonstraram em modelo experimental de DA utilizando camundongos transgênicos (Tg2576) que superexpressam PPA

humana mutada, disfunção do sistema dopaminérgico, sugerindo que a perda de neurônios dopaminérgicos também contribui para os déficits de memória (NOBILI *et al.*, 2017). A PPA (precursor do peptídeo β amilóide), é uma glicoproteína transmembrana encontrada em quase todas as células de mamíferos, inclusive presente em concentração elevada nos neurônios e parece estar envolvida na sinaptogênese, neuritogênese, na regulação da adesão, migração e sinalização neuronal (GRALLE & FERREIRA, 2007). Sua clivagem proteolítica anormal, que gera os peptídeos $A\beta$ tem sido associada a fisiopatologia da DA.

O processamento amiloidogênico da PPA é evento chave na fisiopatologia da DA, que se inicia com a clivagem da PPA pela enzima β -secretase, sendo então formado um fragmento solúvel (sPPA β) e outro fragmento de 99 aminoácidos C terminal que fica retido na membrana (C-99). Posteriormente, o complexo enzimático γ -secretase cliva o peptídeo C99 originando o peptídeo $A\beta$ na porção extracelular da membrana. No entanto, apesar da clivagem do $A\beta$ ser um processo normal, em alguns indivíduos essa condição fisiológica parece estar modificada. Assim, uma vez liberado no meio extracelular, o $A\beta$ tende a agregar de forma patológica. O tamanho desses agregados pode variar desde oligômeros solúveis até fibras insolúveis (RALLE & FERREIRA, 2007; ZHANG *et al.*, 2012).

Outras características patológicas são observadas na DA, como emaranhados neurofibrilares que são constituídos por filamentos de proteína tau hiperfosforilada, nesta condição apresentam mudanças conformacionais e perdem a função fisiológica de estabilização dos microtúbulos. A agregação patológica da proteína tau hiperfosforilada no interior dos neurônios leva a desorganização do citoesqueleto e alterações no transporte axonal, que afeta inclusive o transporte de mitocôndrias para as extremidades axonais, evento responsável pela degeneração distal em função da diminuição do metabolismo (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016). Tem sido também mostrado que o complexo protéico NLRP3 – inflamossoma (um membro da família de receptores tipo NOD) e a proteína de alta mobilidade box-1 (HMGB1), contribuem para a patologia da doença de Alzheimer (ERLANDSSON & HARRIS, 2004; KIM *et al.*, 2018). Estudos sugerem que a ativação do inflammasoma NLRP3 promove níveis

aumentados da expressão de caspase-1 em cérebros com doença de Alzheimer. No entanto, o mecanismo que inicia o processamento de IL-1 β inativa, na doença de Alzheimer, ainda não está claramente definido. Foi relatado recentemente que o processamento mediado por caspase-1 de IL-1 β é mediado por inflamassomas em várias condições patológicas. Os inflamassomas, como o NLRP3, detectam os agregados inflamatórios da β -amilóide e IL1 β inativa, e respondem secretando a caspase-1 (Casp-1) para ativar a IL-1 β . Isso leva à criação de um ambiente inflamatório em torno da placa de β -amilóide, que regula a degradação da proteína do precursor amilóide (PPA), bem como a diminuição da destruição das placas β -amilóides pela micróglia (CUNHA *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Considerando a proteína HMGB1, que é a proteína não-histona mais abundante no núcleo celular, associada na regulação da transcrição gênica, ainda tem apresentado confusão em muitos trabalhos que buscam elucidar o seu papel sinalizador. Sabe-se que HMGB1 é secretada por vários tipos celulares, como macrófagos (microglia); células dendríticas; células de tumores; células endoteliais e também é liberada com o processo de necrose, e apresentam ações também relacionadas ao processo pró-inflamatório em vários tecidos. No sistema nervoso central (SNC), sabe-se que HMGB1 é essencial para o crescimento de neuritos corticais e cerebelares, mas também tem sido associada à progressão da DA, promovendo resposta inflamatória (ERLANDSSON HARRIS & ANDERSSON, 2004).

Além das características previamente citadas, existem outras evidências de que a ativação glial e a neuroinflamação são fatores comuns na patologia dessa desordem. As células da microglia, por exemplo, cumprem papel importante dada sua relevância como reguladora do processo neuroinflamatório. Como já relatado, as células microgliais apresentam um estado de quiescência, vigiando a homeostasia cerebral. Quando ocorre algum dano, essas células rapidamente iniciam a resposta imunológica no sentido de neutralizar o dano e proteger o tecido cerebral adquirindo um fenótipo pro-inflamatório ou anti-inflamatório, dependendo do estímulo causado. Após a resolução do processo inflamatório, as células microgliais voltam ao estado de vigilância, permitindo o retorno da homeostasia cerebral. Trabalhos tem mostrado que a presença de

agregados proteicos do peptídeo beta amiloide ($A\beta$) alteram as funções e a resposta das células microgлияis, alterando o seu fenótipo, e contribuindo na inflamação, em modelos de doença de Alzheimer (DA). Estudos mostram também que existem certos micro-RNAs (miRs) reconhecidos pela sua capacidade de modular a expressão de genes que afetam os fenótipos das células microgлияis, como o miR-124, o miR-155 e o miR-146a. O miR-124 é expresso principalmente na micróglia no estado quiescente, e é responsável pela sua manutenção, enquanto que o miR-155 e o miR-146a estão associados na regulação da expressão de genes envolvidos em vias de sinalização que levam à ativação microgлияl, promovendo um fenótipo inflamatório. Na DA, tem sido mostrado em modelos experimentais que há alteração no perfil de miRNAs. Dentre os miRNAs pró-inflamatórios, tem se destacado o miR-155, que possui sua expressão aumentada no cérebro com DA. Trabalhos com diferentes modelos animais para DA tem mostrado alterações na expressão destes micro-RNAs, contudo ainda não está claro de que forma essa alteração pode afetar a resposta e o fenótipo da micróglia nos modelos de DA estudados (ALOI, *et al.*, 2023; CUNHA *et al.*, 2016; PONOMAREV *et al.*, 2013; SABA *et al.*, 2012).

2.3.2. Abordagens terapêuticas na Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) não tem cura, e sua manifestação está associada à perda de neurônios colinérgicos no cérebro e à diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Como consequência desta perda neuronal, surgem sintomas relacionados a perda de memória, pensamento, linguagem, julgamento e outros processos de pensamento. Na terapêutica da DA, apesar dos medicamentos comercializados auxiliarem na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, ainda não existe um tratamento efetivo que atue de forma a retardar a progressão da doença. Atualmente, a conduta terapêutica para a DA, baseia-se em estratégias farmacológicas e não farmacológicas, com a finalidade de promover melhorias no quadro sintomático. As estratégias não farmacológicas visam agir preventivamente nos potenciais fatores de risco associados a doença, tais como os distúrbios vasculares, factores psicossociais e o estilo de vida. Além disso, a detecção

precoce da DA também contempla uma abordagem não farmacológica, que pode contribuir de forma oportuna na implementação das intervenções terapêuticas. Já para as abordagens farmacológicas, os fármacos hoje utilizados foram projetados para agirem nos sintomas clínicos da doença, tais como os problemas cognitivos e neuropsiquiátricos. Dentre estes fármacos, destacam-se os inibidores da acetilcolinesterase (por exemplo, donepezil, galantamina e rivastigmina) e os antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (por exemplo, memantina) que são utilizados com esta finalidade (COLOVIC *et al.*, 2013; ARBO *et al.*, 2020), embora estas drogas não retardem a progressão da doença. Alternativamente a estas drogas, estudos têm avaliado a imunoterapia, com o uso de anticorpos direcionados contra β -amilóide, como o aducanumab, o lecanemabe e o donanemabe, para o tratamento da doença de Alzheimer precoce. O aducanumab, por exemplo, é um anticorpo monoclonal contra β -amilóide, que teve sua aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) em 2021, para o tratamento da doença de Alzheimer precoce. O donanemabe também é um anticorpo que atua contra o peptídeo β -amilóide e vem sendo investigado para o tratamento da DA (SIMS, *et al.*, 2023; WIDERA, BRANGMAN AND CHIN, 2023). Apesar destes anticorpos emergirem como candidatos promissores na redução dos depósitos de amiloide cerebral, o uso destas moléculas ainda não tem apresentado evidências claras quanto a sua eficácia clínica e quanto aos riscos de efeitos adversos graves. O donanemabe, por exemplo, mostrou risco de edema ou hemorragia cerebral em estudo clínico randomizado (SIMS, *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados, buscando avaliar o potencial terapêutico de uma variedade de compostos naturais para as doenças neurodegenerativas, especialmente aqueles derivados de extratos vegetais (ARBO *et al.*, 2020; DOURADO *et al.*, 2020; DE ALMEIDA *et al.*, 2020; WASIK & ANTKIEWICZ-MICHALUK, 2017; WANG *et al.*, 2012). Neste sentido, por exemplo, muitos trabalhos têm evidenciado o efeito de flavonóides na memória, cognição e nos processos de neurodegeneração, indicando o potencial destas moléculas em proteger os neurônios contra lesões induzidas por neurotoxinas e processos neuroinflamatórios (COSTA *et al.*, 2016) . Em estudo realizado por BEKING & VIEIRA (2010), foi sugerido uma correlação do consumo de

flavonoides na dieta com a redução dos níveis de demência, além de seus benefícios para a memória e o processo de aprendizagem. Apesar do mecanismo de ação destas substâncias não estar bem elucidado, a presença de grupamentos hidroxilas aos anéis carbônicos podem estar associado com a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (RICE-EVANS *et al.*, 1996; NIJIVELDT *et al.*, 2001). Em modelo de estudo sobre um dos mecanismos da patogenia da doença de Alzheimer, cuja morte neuronal foi induzida pela utilização de peptídeos β -amiloide, observou-se que dentre os dez flavonoides avaliados, a epicatequina e a epigallocatequina (EGCG) apresentaram atividade antioxidante contra o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), inibindo inclusive a morte de neurônios (CHOI *et al.*, 2014).

Em estudos desenvolvidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da Universidade Federal da Bahia, Brasil (LabNq/ICS-UFBA), foi observado em modelos de co-culturas de neurônios e glia, que o flavonoide agatisflavona (bis-apigenina), isolado da planta regional *Caesalpinia pyramidalis*, pode interferir, através da ativação de receptores de estrógenos, com a proliferação e viabilidade celular induzindo diferenciação neuronal. Este flavonoide foi também capaz de induzir neuroproteção contra excitotoxicidade induzida pelo excesso de glutamato associada à ativação da resposta astrocitária (SOUZA *et al.*, 2018). Ainda, em estudos com colaboradores, foi observado que tanto a agatisflavona quanto o seu monômero apigenina, com ou sem associação com o ácido trans-retinóico, promovem a diferenciação de células-tronco embrionárias murinas e humanas em neurônios. Além disso foi mostrado também que a apigenina apresentou efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios em modelos de cultura associados a doença de Alzheimer (PAULSEN *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2018; DOURADO, *et al.*, 2020). Em outro trabalho foi mostrado o potencial terapêutico e anti-inflamatório de agatisflavona em um modelo *in vitro* de neuroinflamação induzida por LPS, onde foi observado a capacidade do flavonoide em melhorar e preservar a morfologia dos neurônios e em induzir a diminuição da expressão do marcador CD68, associado à redução da proliferação de microglia. Além disso, observou-se também o efeito neuroprotetor, com redução dos níveis de Caspase 3 e aumento da expressão de β -tubulina III, bem como a capacidade demonstrada no controle da expressão

de moléculas inflamatórias CCL5, CCL2, IL6 e IL18 (DE ALMEIDA *et al.*, 2020). Entretanto, mais estudos são necessários no sentido de compreender melhor os mecanismos de ação e interação destas moléculas e como elas contribuem na regulação/modulação dos processos neuroinflamatórios.

2.4. FLAVONÓIDES: POTENCIAL FARMACOLÓGICO E NEUROPROTETOR NO SNC

Os flavonoides, são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células vegetais, sendo derivados do metabolismo secundário das plantas, estão amplamente distribuídos no reino vegetal (Figura 2). Estas moléculas representam o maior grupo de compostos fenólicos naturais, e vários efeitos biológicos são atribuídos a este grupo de substâncias, tais como atividades antioxidantes, antimicrobianas, antivirais, antitumorais e anti-inflamatórias (NASCIMENTO *et al.*, 2021; DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; CHAVES *et al.*, 2022; DOURADO, *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2016; PANCHE *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2012).

No sistema nervoso central (SNC), o mecanismo pelo qual os flavonóides podem exercer suas funções ainda não está muito claro. Entretanto, estudos têm demonstrado algumas influências de flavonóides sobre este sistema, como, por exemplo, as evidências já descritas de ação neuroprotetora promovida por algumas classes de flavonóides, tais como a modulação de cascatas de sinalização intracelular envolvidos no controle da sobrevivência, morte e diferenciação; efeitos na expressão de genes, efeitos mitocondriais e efeito anticolinesterásico (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; PANCHE *et al.*, 2016).

O efeito neuroprotetor tem sido mostrado em muitos trabalhos. MERCER *et al.*, (2005) demonstraram que polifenóis naturais apresentam potente ação neuroprotetora para neurônios dopaminérgicos em cultura. SPOHR *et al.*, (2009), mostraram o efeito neuroprotetor do flavonóide casticina, extraído da *Croton betullaster* (planta encontrada no estado da Bahia-Brasil), em cultura de neurônios do córtex cerebral de rato. Foi observado neste trabalho que a casticina aumentava a população celular marcada para β III-tubulina e para o fator de transcrição neuronal Tbr2. Além disso, foi observado que os astrócitos eram mediadores ativos dos efeitos da casticina, pois em cultura de células

progenitoras neuronais com monocamadas de astrócitos previamente tratados com casticina, houve indução de um aumento de cerca de 40% da população neuronal. Este evento foi mediado pela secreção de fatores neuroprotetores solúveis, pelos astrócitos que protegeu os progenitores neuronais da morte celular por apoptose (SPOHR *et al.*, 2009).

O biflavonóide agatisflavona (Figura 2) é um flavonoide oriundo de variadas espécies de plantas usadas na medicina tradicional e moderna e tem demonstrado importantes efeitos biológicos de potencial farmacológico, como o efeito antiviral, antioxidante, antitumoral e neuroprotetor (CHAVES *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2018; PAULSEN *et al.*, 2011). Vários estudos tem mostrado os efeitos antiinflamatórios da agatisflavona em modelos de culturas com linhagens de células humanas e de animais. Dentre estes efeitos, podemos destacar a capacidade de inibir a liberação de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 beta (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6). Além disso, tem sido mostrado efeito na redução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da enzima ciclooxigenase (COX)-2 por meio da sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (ISLAM *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2021; DE ALMEIDA *et al.*, 2020). No entanto, apesar dos efeitos neuroprotetores já descritos, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares envolvidos na ação deste flavonóide.

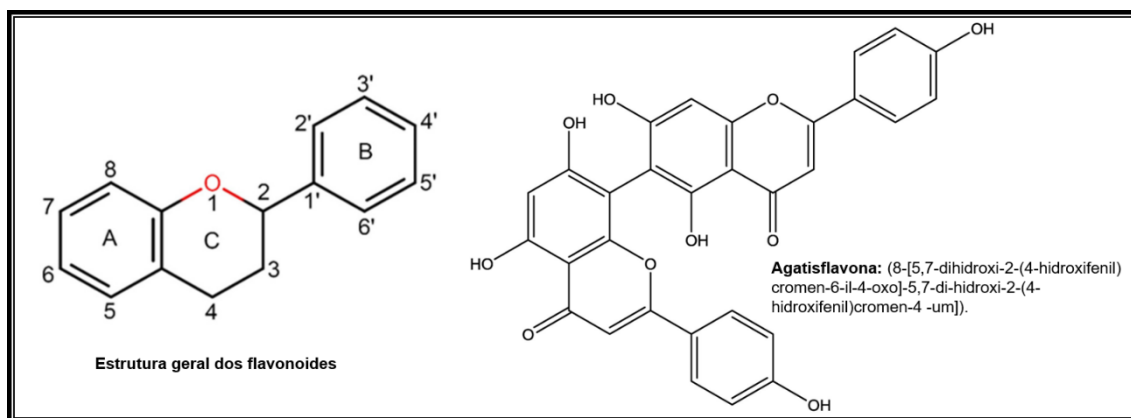


Figura 2: Estrutura química geral dos flavonoides e estrutura química do flavonoide agatisflavona (Adaptado de FORMICA & REGELSON, 1995; DO NASCIMENTO *et al.*, 2022 e LOPES *et al.*, 2019).

Outro flavonoide que tem apresentado a capacidade de modular a resposta imunológica no SNC é a rutina. Neste aspecto, SILVA *et al.*, (2008), mostrou que a rutina foi capaz de regular os níveis do neuromediador NO e da citocina pró-inflamatória TNF- α , liberados no meio de culturas primárias de astrócitos e micróglia. Em outro estudo realizado por SILVA *et al.*, (2017), foi mostrado que o flavonóide rutina induzia proliferação de células microgлияis e alterações no perfil morfológico destas células, após indução de estímulo inflamatório com LPS em culturas primárias de micróglia. Além disso, os autores mostraram também que o flavonóide induziu a ativação das células microgлияis caracterizada por um aumento nas células positivas para OX-42 e uma grande proporção de células com um fenótipo M2 positivo para CD150 / CD206 (fenótipo associado a perfil antiinflamatório). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado também que a rutina reduziu os níveis de expressão de citocinas e mediadores inflamatórios, como TNF, IL1 β , IL6, iNOS e óxido nítrico, e aumentou a produção da citocina reguladoras do perfil celular M2, como a IL10 e arginase, mostrando assim, a capacidade da rutina em modular a resposta imune, a partir de um dano inflamatório. Além dos efeitos antiinflamatórios e neuroprotetor, vale destacar o efeito anticolinesterásico que alguns flavonoides tem apresentado, com destaque para a quercetina e a macluraxantona, que demonstraram em estudos *in vitro*, possuir uma capacidade de inibição dependente da concentração contra a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (PANCHE *et al.*, 2016).

Mais recentemente, trabalhos vem mostrando também a capacidade de flavonoides na regulação de algumas moléculas de micro-RNAs (miRNAs), através da interação com as vias de sinalização celular, modulando a expressão gênica, influenciando a atividade de fatores de transcrição a partir da modulação de moléculas de microRNAs (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022). Estudos tem mostrado, por exemplo, o papel neuroprotetor da quercetina ao regular vários miRNAs potencialmente envolvidos na doença de Alzheimer (DA), como o miR-125b, miR-26a, miR-132, miR-219, miR-15a, miR-146a, miR-9 (BENAMEUR *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020; EVANS *et al.*, 2022; EBRAHIMPOUR *et al.*, 2020). Outros trabalhos tem apontado o efeito do flavanol epigallocatequina (EGCG) em aumentar os níveis de miR-125b-5p no soro de camundongos transgênicos App/Ps1203 e em células neuronais tratadas com peptídeo A β *in vitro*. Além disso, a PARKER *et al.*, (2009) mostraram que a isoflavona genisteína regulou

positivamente a expressão de miR-342 em câncer de ovário. Portanto, diferentes classes de flavonoides podem ter potenciais benefícios neurocognitivos e antiinflamatórios ao modular a expressão de miRNAs em modelos experimentais da doença de Alzheimer (DA). Contudo, ainda são poucos os trabalhos que mostram o papel de flavonóides na regulação de miRNAs associados a doenças neurodegenerativas, logo sendo necessários mais estudos para validar alvos de miRNAs e os seus mecanismos moleculares envolvidos na neurodegeneração (BENAMEUR *et al.*, 2021; MEDRANO-JIMÉNEZ *et al.*, 2022; HONG *et al.*, 2017; MILENKOVIC *et al.*, 2013; PARKER *et al.*, 2009).

Todos estes achados recentes, sobre a ação de flavonóides em células do SNC, mostram o potencial destes compostos na morfogênese, na regulação do crescimento, na modulação da resposta imune e alteração da fisiologia destas células. Contudo, ainda é muito escasso o conhecimento sobre os mecanismos associados a estes efeitos promovidos pelos flavonóides e seus derivados no SNC, principalmente no tocante a modulação da resposta imune celular e na regulação da expressão de mediadores da resposta inflamatória. Neste sentido, destaca-se a importância de desenvolver estudos sobre efeitos e mecanismos de ação de flavonóides para esclarecimentos e aplicações no âmbito das patologias do SNC como é o caso das doenças neurodegenerativas.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

O flavonóide agatisflavona apresenta capacidade de modular a resposta inflamatória promovida pela microglia a um perfil antiinflamatório, regulando negativamente a produção de mediadores inflamatórios e dos miRs 146a e 155, em modelos experimentais associados à doença de Alzheimer.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito e mecanismos antiinflamatórios do flavonóide agatisflavona na resposta microglial em modelos experimentais associados à doença de Alzheimer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antiinflamatório do flavonóide agatisflavona através da mensuração dos níveis de expressão das citocinas inflamatórias e do complexo protéico inflamatório NLRP3-inflamossoma, em microglias de ratos submetidas a dano inflamatório por LPS.
- Avaliar o potencial antiinflamatório do flavonóide agatisflavona através da mensuração dos níveis de expressão de micro-RNAs e citocinas inflamatórias em cultura de microglias humanas submetidas a dano inflamatório por LPS e oligômeros de peptídeos β -amilóide.

4.0 CAPÍTULO 1: artigo científico 1: The Flavonoid Agathisflavone Directs Brain Microglia/Macrophages to a Neuroprotective Anti-Inflammatory and Antioxidant State via Regulation of NLRP3 Inflammasome.

Autores: Balbino Lino dos Santos ^{1,2}, Cleonice Creusa dos Santos ¹, Janaina R. P. Soares ¹, Karina C. da Silva ¹, Juciele Valeria R. de Oliveira ¹, Gabriele S. Pereira ³, Fillipe M. de Araújo ^{1,3}, Maria de Fátima D. Costa ¹, Jorge Mauricio David ⁴, Victor Diogenes A. da Silva ¹, Arthur M. Butt ⁵ and Silvia Lima Costa ¹

1. Laboratory of Neurochemistry and Cellular Biology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon S/N, Salvador 40231-300, Brazil;

2. College of Nursing, Federal University of Vale do São Francisco, Petrolina 56304-917, Pernambuco, Brazil

3. Group of Studies and Research for Health Development, University Salvador, Salvador 40140-110, Bahia, Brazil;

4. Department of General and Inorganic Chemistry, Institute of Chemistry, University Federal of Bahia, Salvador 40170-110, Brazil;

5. School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth PO1 2UP, UK.

Publicação: 05 de maio de 2023 na revista *Pharmaceutics*.

DOI: 10.3390/pharmaceutics15051410

DOS SANTOS BL, DOS SANTOS CC, SOARES JRP, DA SILVA KC, DE OLIVEIRA JVR, PEREIRA GS, DE ARAÚJO FM, COSTA MFD, DAVID JM, DA SILVA VDA, BUTT AM, COSTA SL. The Flavonoid Agathisflavone Directs Brain Microglia/Macrophages to a Neuroprotective Anti-Inflammatory and Antioxidant State via Regulation of NLRP3 Inflammasome. *Pharmaceutics*. 2023 May 5;15(5):1410.

Abstract: Agathisflavone, purified from *Cenostigma pyramidale* (Tul.) has been shown to be neuroprotective in in vitro models of glutamate-induced excitotoxicity and inflammatory damage. However, the potential role of microglial regulation by agathisflavone in these neuroprotective effects is unclear. Here we investigated the effects of agathisflavone in microglia submitted to inflammatory stimulus in view of elucidating mechanisms of neuroprotection. Microglia isolated from cortices of newborn Wistar rats were exposed to *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL) and treated or not with agathisflavone (1 µM). Neuronal PC12 cells were exposed to a conditioned medium from microglia (MCM) treated or not with agathisflavone. We observed that LPS induced microglia to assume an activated inflammatory state (increased CD68, more rounded/amoeboid phenotype). However, most microglia exposed to LPS and agathisflavone, presented an anti-inflammatory profile (increased CD206 and branched-phenotype), associated with the reduction in NO, GSH mRNA for NLRP3 inflammasome, IL1-β, IL-6, IL-18, TNF, CCL5, and CCL2. Molecular docking also showed that agathisflavone bound at the NLRP3 NACTH inhibitory

domain. Moreover, in PC12 cell cultures exposed to the MCM previously treated with the flavonoid most cells preserved neurites and increased expression of β -tubulin III. Thus, these data reinforce the anti-inflammatory activity and the neuroprotective effect of agathisflavone, effects associated with the control of NLRP3 inflammasome, standing out it as a promising molecule for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

Keywords: anti-neuroinflammatory; agathisflavone; neuroprotection; NLRP3 inflammasome

1. Introduction

Neuroinflammation orchestrated by glial cells, especially astrocytes, and microglia, is a fundamental element in the development of neurodegenerative diseases (NDD), such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease [1]. Microglia can assume distinct phenotypic states according to the microenvironmental stimulus to which they are exposed and may present an inflammatory or anti-inflammatory profile [2]. Hence, microglia are key for the progression of neurodegenerative diseases (NDD), since they are associated with the synthesis and secretion of cytokines and other mediators that contribute to both CNS damage and repair.

In vitro, studies have shown that the release of pro-inflammatory cytokines in microglial activation is dependent on the MAPKs and NF- κ B signaling pathways, as well as on the activation of the NLRP3 inflammasome [1]. The NLRP3 inflammasome protein complex has been recognized for its crucial role in the innate immune response in neuroinflammatory processes, and its assembly requires the activation of the TLR4/NF- κ B pathway, which promotes the expression of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 [2].

Flavonoids have shown in vitro neuroprotective properties, attenuating the activation of microglia exposed to harmful stimuli [3–7]. These molecules are a group of polyphenolic compounds, of low molecular weight and soluble in water. They comprise a group of metabolites originating from different plant species and exhibit a variety of biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, antimicrobial, and antiviral actions [4,6,7]. Studies show the potential of some flavonoids, such as icariin, fisetin, and rutin, to modulate inflammatory responses [3,4]. The biflavonoid agathisflavone present in *Poincianella*

pyramidalis (Tul.) has been shown to be neuroprotective in in vitro models of glutamate-induced excitotoxicity and inflammatory damage [5–7]. However, the potential role of microglial regulation by agathisflavone in these neuroprotective effects is unclear. In this study, we analyzed the effect of conditioned medium from microglia treated with LPS and/or agathisflavone in PC12 cells to clarify the role of the anti-inflammatory effect of agathisflavone as a mechanism of neuroprotection.

2. Materials and Methods

2.1. Microglial Cell Cultures

Microglial cells were obtained from the cortex of newborn Wistar rats (0–2 days old). The animals were provided by the Animal Facilities of the Department of Physiology of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia (Salvador, BA, Brazil). All experiments were performed in accordance with the local Ethical Committee for Animal Experimentation of the Health Sciences Institute (CEUA protocol no 6731220818).

Isolation of microglia was performed according to the protocol established at the Guaza Laboratory at the Instituto Cajal in Madrid [8]. The brains of newborn Wistar rats were removed aseptically, meninges and blood vessels were removed from each cortex. Then the material was mechanically dissociated and filtered into a sterile 75 mm diameter Nitex membrane (R&D®). The filtrate was resuspended in DMEM medium (Island Biological Company- GIBICO®, in New York, United States), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum (HS), 4 mM L-glutamine, antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Gibco®). The cells were cultured on poly-D-lysine (25 µg/mL) -coated flasks (TPP, Zellkultur, Switzerland) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Upon reaching confluence (7–10 days), adherent microglial cells were harvested by shaking at 165 rpm at 37 °C for 3 h. Isolated microglia were seeded into 96-, 24- or 6-well plates at a density of 3 × 10⁴/cm²; in 24-well plates, cells were grown under the surface of coverslips. The experiments were performed 24 h after plating. In all cases, the cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂.

2.2. Culture and Differentiation of PC12 Cells

PC12 are pheochromocytoma cells derived from the rat adrenal gland (*Rattus norvegicus*) and have been used for many years as an important in vitro model for neurons, because they exhibit the characteristic phenotype of neurons, such as the emission of long branched neurites and also cease mitotic activity, when stimulated with growth factors, such as neuronal growth factor (NGF) and fibroblast growth factor 1 (FGF1) [9,10]. In this study, PC12 cells were cultured in adherent Petri dishes containing DMEM medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS, 10% HS, 4 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Gibco®). The plates were kept in culture chambers at 37 °C and 5% CO₂. When the cultures reached confluence, they were detached from the culture plates using a solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS, 1X). After that, the cells were centrifuged at 1000 RPM, and seeded at a low concentration of 2×10^5 cells per well in 24-well plates and incubated for 24 h. Then, for differentiation, the cells were treated with 100 ng/mL of NGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 6 days. The NGF was dissolved in the culture medium, the medium being renewed every 48 h and maintaining the same concentration as the NGF. After this period of differentiation, the cells were treated with microglia conditioned medium (MCM).

2.3. Drugs and Treatments

Cell cultures were treated with the biflavonoid agathisflavone (FAB) extracted from *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis (syn: *Poincianella pyramidalis*, *Caesalpinia pyramidalis*), as previously described [11]. The flavonoid was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) at a stock concentration of 100 mM and stored at a temperature of 4 °C and protected from light. The concentration used in the treatment was 1 µM, after diluting in DMEM. To induce the inflammatory stimulus, treatment with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich, Burlington, United States) was performed, at a concentration of 1 µg/mL; final dilution was obtained at the time of treatment by diluting the stock solution directly into the fresh culture medium without FBS. For microglial cell treatment, the medium was replaced by a new

culture medium containing 1 μM agathisflavone or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or both flavonoid and LPS. The concentration and exposure time followed established protocols and took into account our previous studies concerning agathisflavone effects in vitro [5,6]. Control cultures were treated with DMSO diluted in a culture medium in a volume equivalent to agathisflavone concentration (0.01%). After 24 h of treatments, the microglial conditioned medium (MCM) from the control and treatment conditions (agathisflavone, LPS, and LPS with agathisflavone) were collected and used in the treatment of PC12 cells for 24 h. Experimental analyses were performed 24 h after treatments.

2.4. Cell Cytotoxicity Analysis

The MTT viability assay was used to assess cytotoxicity in microglia. For this, cells treated for 24 h with agathisflavone (1 μM) and/or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or in the control condition (DMSO) were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl bromide)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT; Sigma). The cells were cultured in 96-well plates (Kasvi) for 24 h. After this period, the cultures were incubated with the MTT solution at a final concentration of 1 mg/mL for 2 h. Then, the solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) at 20% (w/v) and dimethyl formamide (DMF) at 50% (v/v), at pH 4.7 to promote cell lysis. Then, the plates were kept at 37 °C overnight to dissolve formazan crystals. Cell viability was quantified by converting the yellow MTT into formazan to purple, promoted by mitochondrial dehydrogenases from living cells [12]. For this, the optical density of each sample was measured at 540 nm using a microplate reader. Three independent experiments were carried out for each analysis. The results were expressed as the percentage of viability of the treated groups in relation to the control, which was considered 100%.

2.5. Assessment of Reduced Glutathione Depletion

Reduced glutathione (GSH) is an important antioxidant compound for CNS cells, as it serves as a substrate for peroxidases and is conjugated with free radicals [13]. Here, we evaluated the protective effect of the flavonoid agathisflavone on LPS-induced cytotoxicity in primary microglia culture, through the determination of intracellular GSH. For this, the cells were seeded at a density of $3 \times 10^4/\text{cm}^2$, and after stimulation with LPS and treatment with agathisflavone,

the cells were washed three times with PBS and incubated with 400 μL of medium containing 1 mM of monochlorobimane (MCB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min in the dark. L-buthionine-S-R-sulfoximine (BSO) was used at a concentration of 1 mM as an inhibitor of GSH synthesis and adopted as a positive control. After the incubation time, the cells were washed again with PBS. The detection of free glutathione was performed using a fluorescence microscope (Leica, DFC7000, Wetzlar, Germany). Three independent experiments were carried out.

2.6. NO Production

Evaluation of the production of nitric oxide was carried out in samples of the cell culture medium, from the determination of the accumulation of sodium nitrite (NaNO_2^-) in the medium. For this, samples of medium were collected after treatment with LPS and/or agathisflavone at 1 μM . Equal volumes of culture medium and Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, and 2% phosphoric acid; Sigma Aldrich, Saint Luis, United States) were mixed. The mixture was incubated for 10 min at room temperature and then the absorbance was read on a 550 nm filter using a microplate reader (Varioskan—Flash Multimode Reader, ThermoPlate, Thermo Fisher Scientific, Inc., Vantaa-Finland). Three independent experiments were carried out.

2.7. Cell-Free Screening of Agathisflavone Antioxidant Activity DPPH• Free Radical Scavenging Test

The DPPH• radical scavenging assay was performed according to the method described by Blois (1958) [68] with some modifications for a 96-well microplate. The DPPH• radical stock solution was prepared in methanol to present an absorbance between 0.6 and 0.7 at 517 nm. Reaction volumes of 200 μL , containing 125 μM of DPPH• radical was prepared in methanol, and 50 μL of different concentrations of agathisflavone (1, 10, and 50 μM) were incubated at 25 ± 2 °C for 15 min and reading performed in the microplate reader (Varioskan—Flash Multimode Reader, ThermoPlate, Thermo Fisher Scientific, Inc., Vantaa-Finland) at a wavelength of 517 nm. This test was performed in the dark and at room temperature. The percentage of DPPH• inhibition was calculated by the

following equation: % DPPH inhibition = $100 - [(sample\ Abs - blank\ Abs)/control\ Abs] \times 100$, where sample Abs is the flavonoid agathisflavone/trolox, blank Abs is methanol and Abs control DPPH• + 0.05% DMSO. Methanol was used as a negative control. Trolox (vitamin E analogue) was used as a positive control and treated under the same conditions as the sample. IC50 values denote the concentration of the sample, which is required to eliminate 50% of the DPPH radicals. Three independent experiments were carried out.

2.8. Proliferation, Apoptosis, Morphology, and Cell Activation through Immunocytochemistry

The evaluation of microglial activation to LPS and/or treatment with flavonoid agathisflavone was investigated through immunocytochemistry using the following primary antibodies: anti-Iba1 (rabbit, 1: 200; Wako, 019-19741, Saitama, Japan), anti-CD68 (rat, 1: 100; Abcam, ab53444, Cambridge, United Kingdom), anti-CD206 (rat, 1: 100, Bio-Rad, Hercules, United States). Changes in the morphology of differentiated PC12 cells after treatment with microglia-conditioned medium, were evaluated by phase contrast microscopy and by immunocytochemistry for the cytoskeleton protein β -tubulin III (mouse, 1: 500; BioLegend, San Diego, United States 801202) and the presence of apoptotic PC12 cells evaluated using anti-active-caspase-3 antibodies (rabbit, 1: 300; Chemicon, ab3623 Darmstadt, Germany). Immunocytochemistry was performed in 24-well plates, with cells grown under the coverslip surface. After treatments, the culture medium was discarded, and the cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, Sigma) and then fixed with cold methanol for 20 min at room temperature (RT). Then, the cultures were washed three times with PBS and exposed to the primary antibodies diluted in PBS/BSA (1%) and kept in a humid chamber at 4 °C overnight. The next day, the cells were washed 3 times with PBS and then incubated with the following secondary antibodies diluted in PBS/BSA (1%): Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, (1:500, Life Technologies, Carlsbad, United States), Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500, Life Technologies, Carlsbad, United States). Incubation with secondary antibodies was kept under slow shaking for 2 h at RT and protected from light. After that, the cells were washed three times with PBS and incubated with 5.0 mg/mL of 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes,

Eugene, OR, USA), at RT for 10 min for nuclear staining. Then, the coverslips containing the cells were washed three times in PBS and mounted on slides containing the glycerol N-propyl-gallate solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The experiments were carried out in triplicate. Quantification was analyzed using ImageJ 1.33u software (Wayne Rasband, National Institute of Health, United States). The images were observed and photographed using the fluorescence microscope (Leica, DFC7000).

2.9. Quantitative RT-PCR

To evaluate gene expression for proteins of interest, after the treatment period, the culture medium was removed and then total RNA was extracted with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Life Technologies, 15596026). Extraction was performed according to the manufacturer's specifications. Total RNA purity and concentration were determined by spectrophotometric analysis using KASVI Nano Spectrum (cat# K23-0002). DNA contaminants were removed by treating the RNA samples with DNase using the Ambion DNA-free kit (cat# AM1906, Life Technologies[™]). For cDNA synthesis, SuperScript[®] VILO[™] MasterMix (cat# MAN0004286, Invitrogen[™], Life Technologies) was used in a 20- μ L reaction with a concentration of 2.5 μ g of total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using Taqman[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) containing two primers to amplify the sequence of interest, a specific Taqman[®] MGB probe and TaqMan Universal Master Mix II with UNG (cat# 4440038 Invitrogen, Life Technologies[™]). The assays corresponding to the genes quantified in this study were IL1B (Rn00580432_m1), TNF Loc1036 (Rn01525859_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), CCL2 (Rn00580555_m1), CCL5 (Rn00579590_m1), NRLP3 (Rn04244620). Real-time PCR was performed using the Quant Studio 7 Flex[™] Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). The thermocycling conditions were performed according to the manufacturer's specifications. The actin beta (ACTB) (Rn00667869_m1) and hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1) (Rn01527840_m1) targets were used as reference genes (endogenous controls) for normalization of gene expression data. Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The results represent the average of three independent experiments.

2.10. Molecular Docking

To download the three-dimensional structure of the NLRP3 protein in pdb format, the database platform AlphaFold Protein Structure Database was used <https://alphafold.ebi.ac.uk> (accessed on 10 November 2022). Crystallographic structures from *Rattus norvegicus* and *Homo sapiens* without mutations were chosen. The agathisflavone ligand was downloaded on the platform ZINC15 www.zinc.docking.org (accessed on 10 November 2022) and MCC950 inhibitors were downloaded from PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on 10 November 2022). The binders were downloaded in pdf format and then converted into pdb format through the program OpenBabel. AutoDockTools software was used to prepare protein and ligands. The water molecules were removed from the receptor and the polar hydrogens and Kollman charges were added... For the ligands, Gasteiger charges were added and then saved in pdbqt. After the preparation of the receptor and ligand, the gridbox was performed defining the binding site with the coordinates determined for the insertion of ligands. The NLRP3 binding site was determined in the NACTH domain, which is formed by amino acids 220 to 536, since studies have already proven the direct interaction of the MCC950 inhibitor with this domain.

The docking was performed by the AutoDockVina program using the command prompt programming language. In the end, the 9 best interactions of the ligand with each protein tested were provided, and the one that presented the lowest value of free energy of binding was chosen for analysis. The visualization and analysis of the interaction took place using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer program. The flavonoid agathisflavone was defined as the ligand and the protein as the receptor. The analysis of the receptor-ligand interactions and then a 2D diagram was generated that made it possible to visualize the intermolecular bonds and all the amino acid residues present in the interaction between the receptor and the ligands, as well as to visualize the interaction in 3D structure.

2.11. Statistical Analyses

The results were analyzed by the GraphPad Prism 5.10 statistical program (San Diego, United States) and recorded as median \pm standard error of the means (SEM) of the evaluated parameters. To determine the statistical difference

between the groups, an analysis of variance was performed using the OneWay ANOVA test, followed by the Student–Newmann–Keuls post-test for the parametric data. For nonparametric data, an analysis was performed using Kruskal-Walis and Dunns post-test. Confidence intervals were defined at a 95% confidence level ($p < 0.05$) was considered statistically significant). In all figures, error bars represent the SEM of at least three independent experiments.

3. Results

3.1. *Agathisflavone Modulates the LPS-Induced Microglial Activation Profile*

It is known LPS is capable of inducing microglia activation and inflammatory responses. Here, we investigated the effects of agathisflavone (FAB1) on microglia, alone and with LPS, to determine its effects on LPS-induced microglial activation; the DMSO vehicle (0.0001%) was used in control cultures. Firstly, to assess the effects of treatments on cell morphology and viability, we used the MTT test plus phase contrast microscopy (Figure 1), together with immunostaining for Iba-1 (Figure 2). In the control cultures and those treated with agathisflavone alone, microglia had a predominantly multipolar and branched morphology, with thin and long processes extending from small and rounded cell bodies (Figure 1A—some indicated by yellow arrows). In contrast, in LPS-treated cultures, microglia displayed a rounded or amoeboid morphology, with a reduction and retraction of their cytoplasmic processes, which were less numerous, shorter, and thicker (Figure 1A, some indicated by white arrows). These morphological changes were reduced by simultaneous treatment with LPS and agathisflavone and ramified microglia were more evident (Figure 1A, some indicated by yellow arrows). Quantification of microglial morphology confirmed these changes and demonstrated a significant increase in the relative density of amoeboid microglia following LPS treatment, which was significantly reduced by combined treatment with agathisflavone (Figure 1B). In addition, the MTT assay demonstrated a significant decrease in microglial cell viability following LPS treatment and this was significantly reduced by combined treatment with agathisflavone, which was not significantly different from control (Figure 1C).

The ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) is a calcium-binding protein specific for microglia/macrophages, being expressed both in vitro and in vivo. Compared with the control group (DMSO), immunofluorescence staining for Iba1 showed a significant increase following LPS treatment, but not following combined treatment with agathisflavone and LPS (Figure 2A,B). These changes are consistent with the cell counts presented above, which also showed an overall increase in microglial density following treatment with LPS, suggestive of microglial proliferation (Figure 2A,B).

Immunocytochemistry for the CD68 and CD206 proteins was performed to evaluate the effects of agathisflavone (1 μ M) on the phenotypic profile assumed by LPS-treated microglial cells. CD68 is a transmembrane protein and CD206 (also known as mannose receptor C type 1 (MRC1)) is a cell-surface protein that is used to distinguish between inflammatory states of activated microglia. Following treatment with LPS, we observed a significant increase in CD68 expression in microglia identified by Iba-1 immunostaining compared to control (Figure 3A,B). Combined treatment with LPS and agathisflavone also induced a significant increase in CD68 compared to control, but not compared to LPS treatment (Figure 3A,B). Expression of CD206 was significantly decreased in LPS compared to controls and this was partly reversed by combined treatment of LPS and agathisflavone (Figure 4A,B).

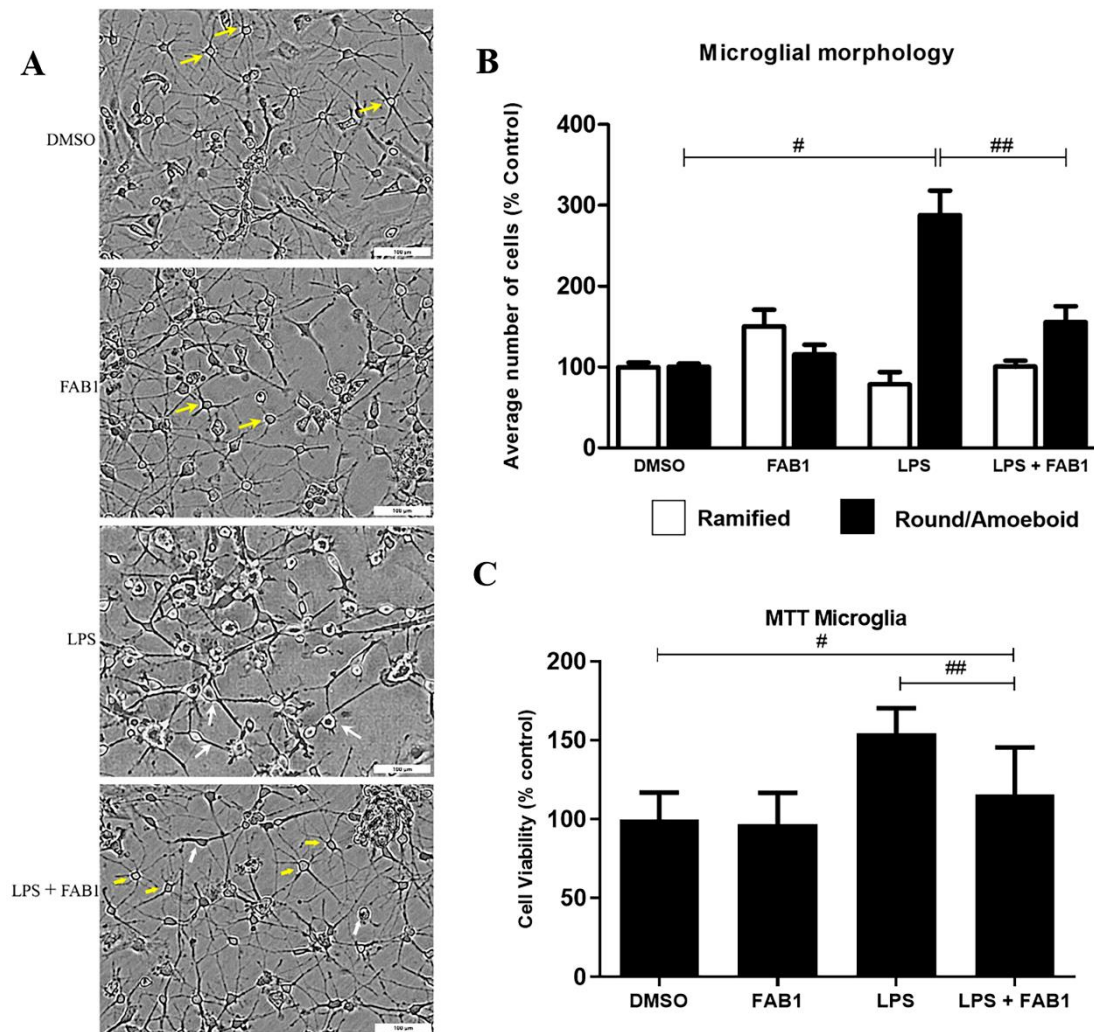


Figure 1. Effects of agathisflavone on LPS-treated microglia. Microglial cell cultures were treated for 24 h with vehicle control (0.001% DMSO), 1 μ M agathisflavone (FAB1), LPS (1 μ g/mL), or combined LPS plus FAB1. **(A)** Phase contrast photomicrographs of microglial cells in the different treatment groups, illustrating the ramified morphology (yellow arrows) and amoeboid morphology (white arrows); scale bar = 100 μ m. **(B)** Quantification of microglia with ramified/branched or round/amoeboid morphology in the different treatment groups; results expressed relative to controls (100%) and tested for significance by one-way ANOVA; # or ## $p < 0.05$ **(C)** MTT analysis of microglial cell viability in the different treatment groups; results expressed relative to controls (100%) and tested for significance by one-way ANOVA; # or ## $p < 0.05$.

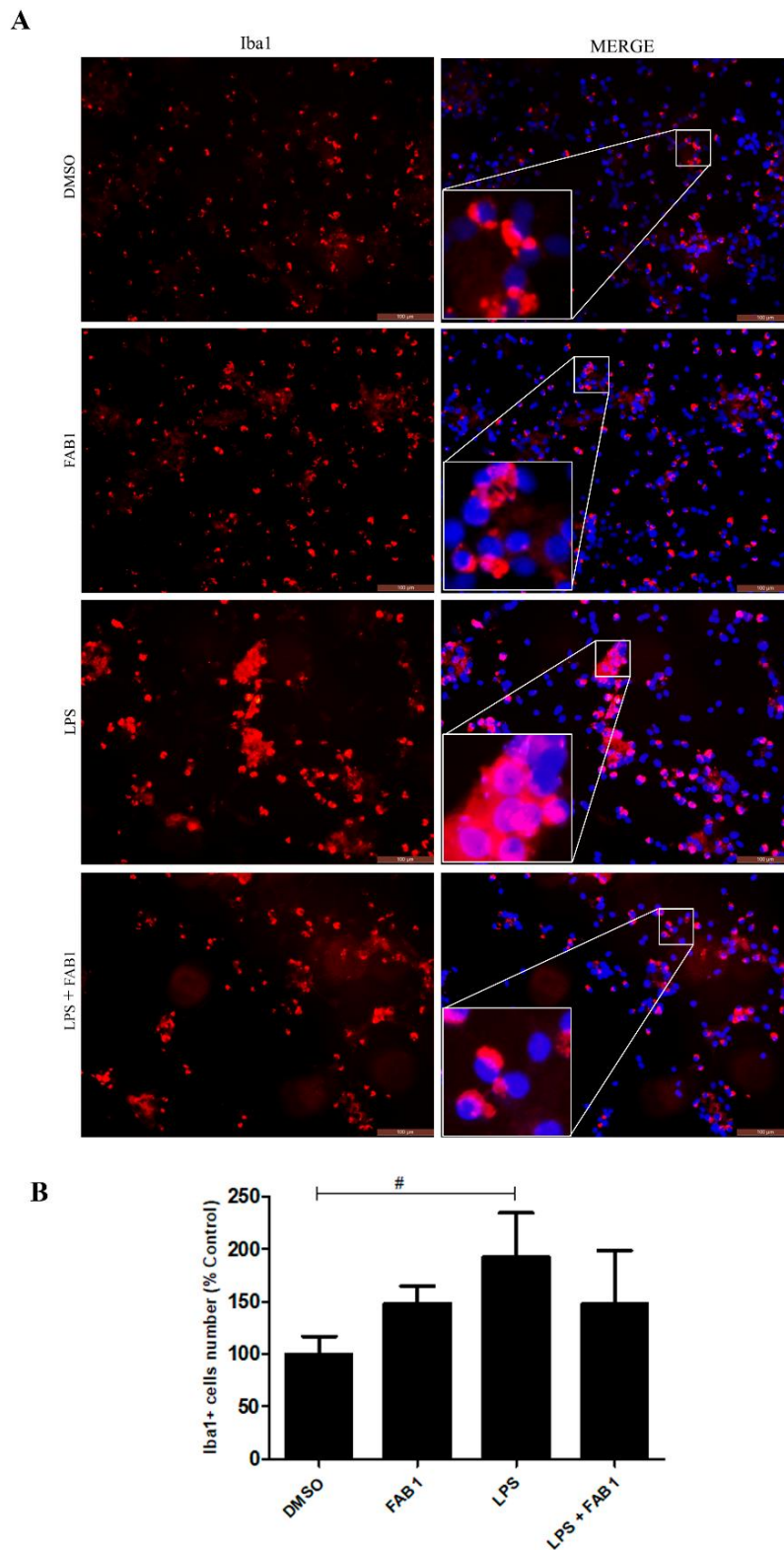


Figure 2. Effects of agathisflavone on Iba-1 expression in LPS-treated microglia. Microglial cell cultures were treated for 24 h with vehicle control (0.001% DMSO), 1 μ M agathisflavone (FAB1), LPS (1 μ g/mL), or combined LPS plus FAB1. **(A)** Immunostaining for Iba-1 (red) in microglial cultures in the different treatment groups; cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m. **(B)** The graph shows the quantification of Iba1+ cells expressed as a percentage of the total number of controls. Error bars represent mean \pm SEM and were tested for significance by

one-way ANOVA; # $p < 0.05$. The results are representative of repeated three independent experiments.

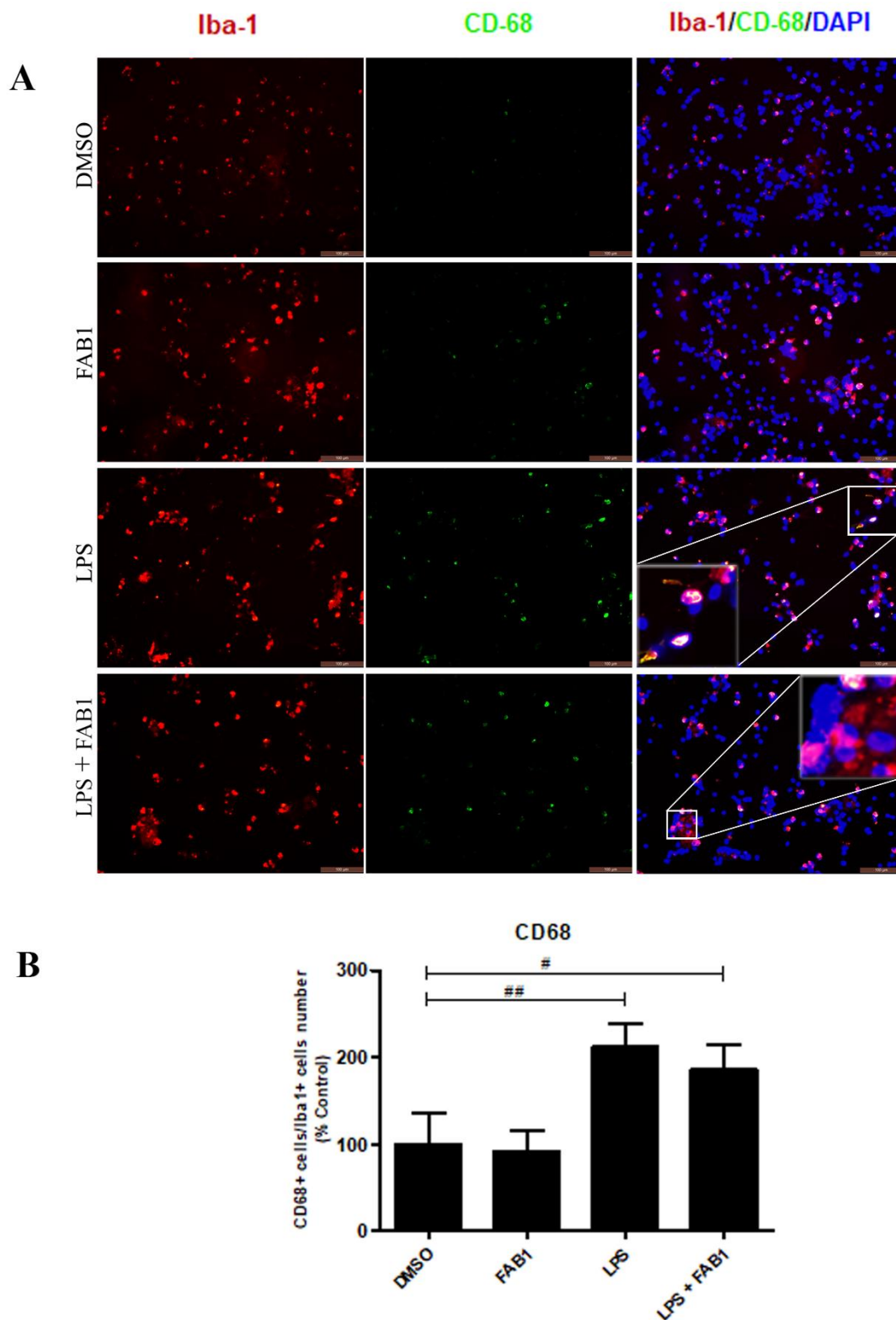


Figure 3. Effects of agathisflavone on CD68 expression in LPS-treated microglia. Microglial cell cultures were treated for 24 h with vehicle control (0.001% DMSO), 1 μ M agathisflavone (FAB1), LPS (1 μ g/mL), or combined LPS plus FAB1. **(A)** Immunocytochemistry of CD68 (green) with Iba1 (red) in microglial cultures in the different treatment groups; cell nuclei were stained with DAPI (blue). The results are representative of repeated three independent experiments. Scale bar =

100 μm . (B) Bar graphs show the percentage of CD68+/Iba-1+ cells in each condition; values are expressed as the mean \pm SEM and were tested for significance by one-way ANOVA; # or ## $p < 0.05$.

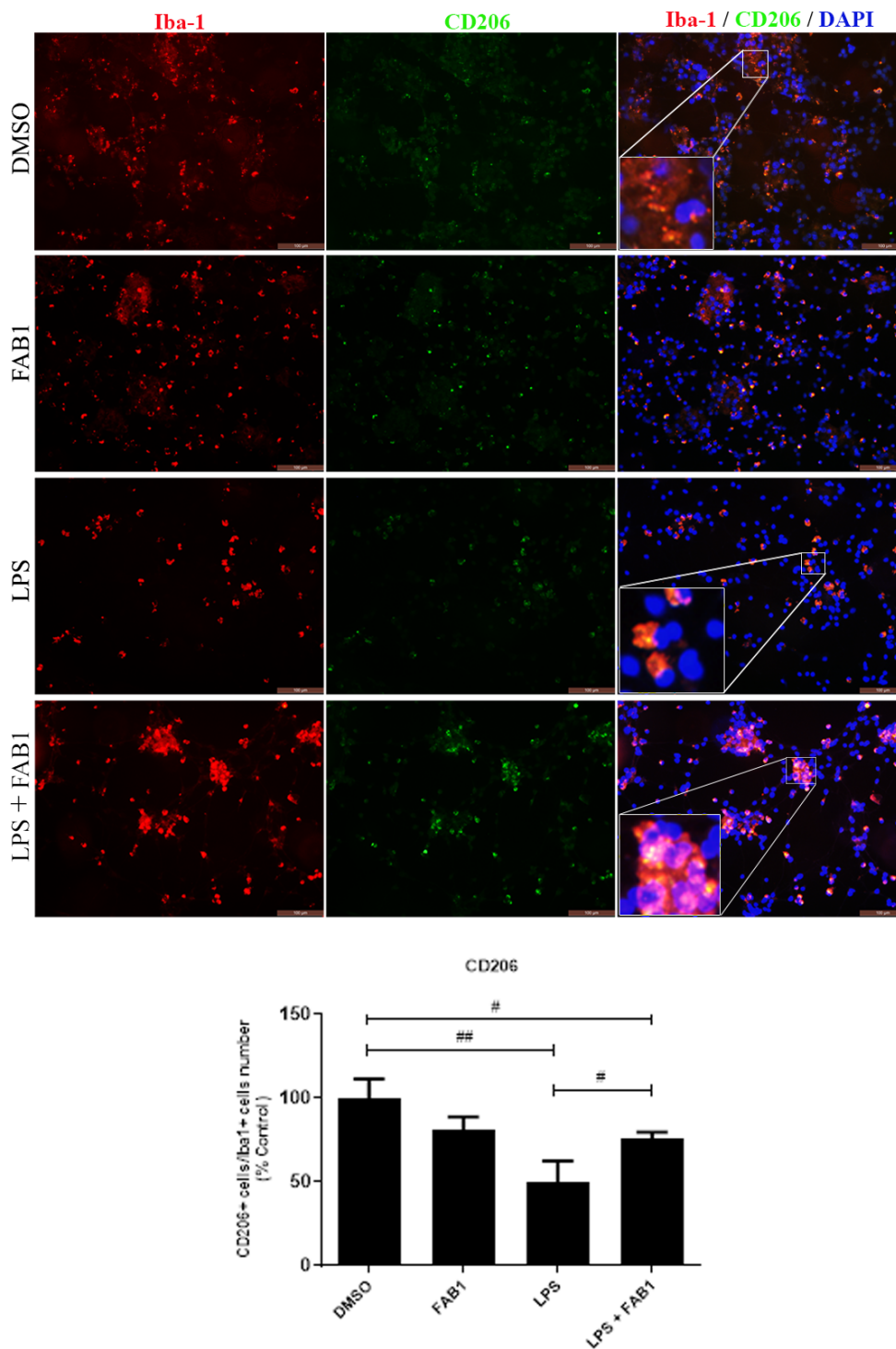


Figure 4. Effects of agathisflavone on CD206 expression in LPS-treated microglia. Microglial cell cultures were treated for 24 h with vehicle control (0.001% DMSO), 1 μM agathisflavone (FAB1), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or combined LPS plus FAB1. (A) Immunocytochemistry of CD206 (green) with

Iba1 (red) in microglial cultures in the different treatment groups; cell nuclei were stained with DAPI (blue). The results are representative of repeated three independent experiments. Scale bar = 100 μ m. **(B)** Bar graphs show the percentage of CD206+/Iba-1+ cells in each condition; values are expressed as the mean \pm SEM and were tested for significance by one-way ANOVA; # or ## $p < 0.05$.

3.2. Agathisflavone Is an Effective Scavenger of Free Radicals and Has an Antioxidant Effect and Reduces NO Production in LPS-Treated Microglia

The monochlorobimane (MCB) test was used to assess intracellular GSH depletion by fluorescence microscopy. Treatment with BSO, a positive control for the technique, resulted in a marked reduction of GSH, and the same was observed in cells treated with LPS, whereas there was evident fluorescence in cultures treated with LPS plus agathisflavone, comparable to controls treated with vehicle DMSO (Figure 5A,B). Nitric oxide (NO) is produced by activated microglia in the presence of a stimulus to inflammatory damage, such as LPS [6], and so we evaluated this by measuring the accumulation of sodium nitrite (NaNO₂-) in the medium after the different treatments. In cultures treated with LPS, there was a significant 3-fold increase in NO compared to the DMSO control group, and this was completely blocked by combined treatment with LPS and FAB1 (Figure 5C). The free radical scavenging activity of agathisflavone was determined using the assay for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), with trolox as a positive control. Agathisflavone had an IC₅₀ of 10.27 μ M, compared to 27.18 μ M for Trolox (control), equivalent to a DPPH elimination capacity of 62.02% and 95.22% for trolox and agathisflavone, respectively (Figure 5D).

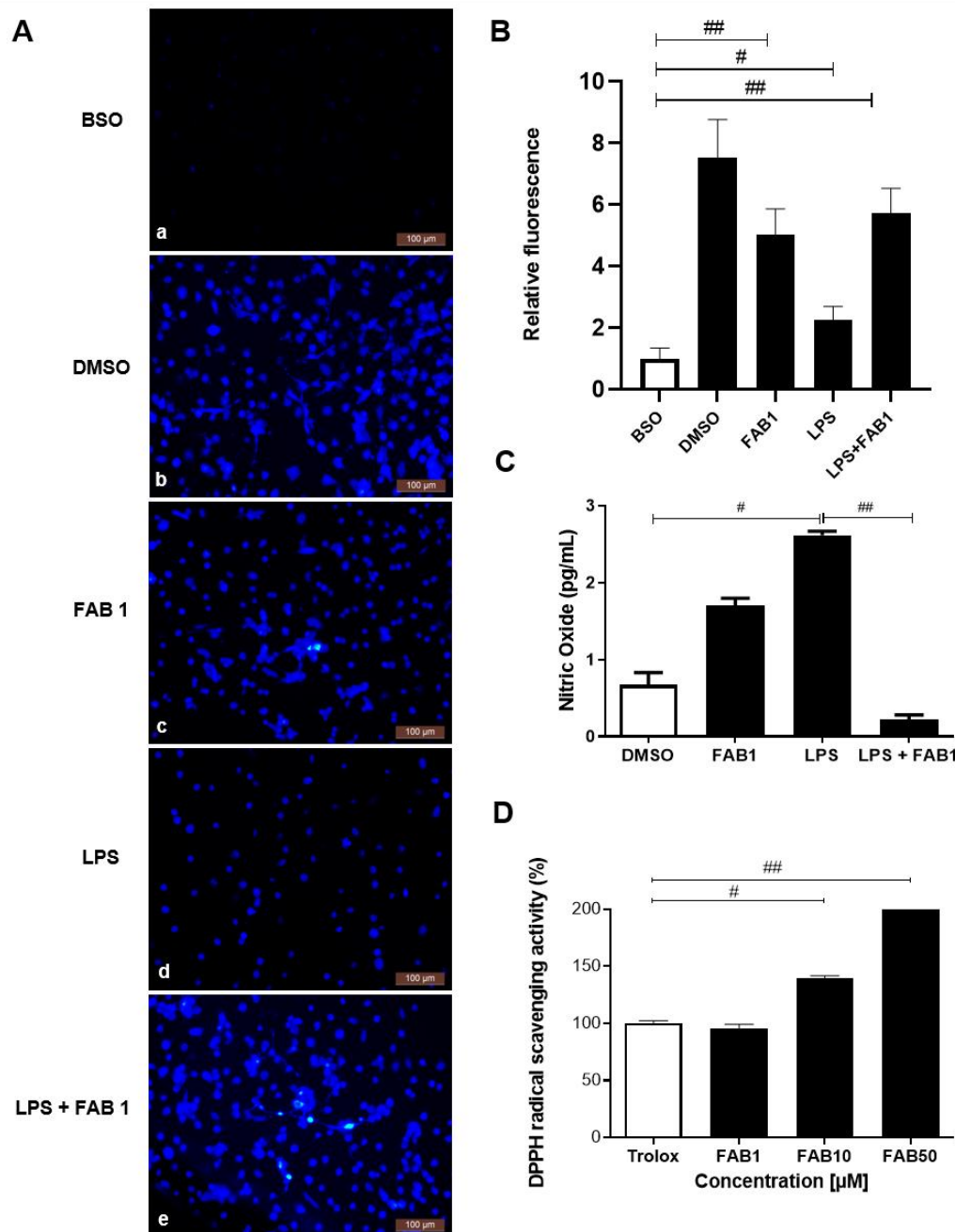


Figure 5. Effects of agathisflavone on GSH depletion and NO production in LPS-treated microglia. **(A)** Fluorescence measurement of glutathione (GSH) using the monochlorobimane (MCB) test in microglial cultures, treated with: **(a)** 1 μ M D,L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO—positive control of the test); **(b)** 0.001% DMSO vehicle; **(c)** 1 μ M agathisflavone (FAB1); **(d)** 1 μ g/mL LPS; **(e)** combined treatment with LPS plus FAB1. Scale bars = 100 μ m. **(B)** Graph showing fluorescence measurement of glutathione (GSH) using the monochlorobimane (MCB) test in microglial cultures, treated with: 1 μ M D,L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO—positive control of the test); 0.001% DMSO vehicle; 1 μ M agathisflavone (FAB1); 1 μ g/mL LPS; combined treatment with LPS plus FAB1. Significance was assessed by the One Way ANOVA test followed by the Tukey test. Values are expressed as the mean SEM (n = 3). # $p < 0.05$ or ## $p < 0.0001$ **(C)** Graph showing the Griess reaction (NaNO₂) for NO determination in microglial cultures incubated with 0.01% DMSO vehicle or treated with 1 μ g/mL of LPS and/or 1 μ M of agathisflavone (FAB1), for 24 h. Significance was assessed by the One Way ANOVA test followed by the Tukey test. Values are expressed as the mean SEM (n = 3). # or ## $p < 0.05$. **(D)** Activity of agathisflavone and trolox (standard) in scavenging the DPPH radical. The DPPH scavenging capacity of agathisflavone and the trolox control was compared over 15 min. Values are mean \pm SEM (n = 2) # or ## $p < 0.05$ when compared to trolox (standard) for each concentration.

3.3. Agathisflavone Regulates Gene Expression of Neuroinflammatory Mediators in LPS-Treated Microglia

In order to better characterize the anti-inflammatory effect of agathisflavone in microglial cultures exposed to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), RT-qPCR was used to measure mRNA expression of the following inflammatory mediators: interleukin 6 (IL-6), interleukin 1- β (IL1- β), tumor necrosis factor (TNF) and chemokines CCL5 and CCL2. In LPS-treated microglial cultures, there were significant increases in mRNA expression for IL-6, IL1- β , TNF, CCL2, and CCL5, when compared to controls (Figure 6). Combined treatment with agathisflavone significantly reduced mRNA expression for IL-6, IL1- β , and CCL5 compared to cultures treated with LPS alone; agathisflavone did not protect against the LPS-induced increases in TNF and CCL2 mRNA expression and did not completely protect against the increase in IL-6, which were significantly greater than controls. In addition, we evaluated the effect of agathisflavone in modulating the expression of the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome, which corresponds to a protein complex associated with the activation of caspase-1 and the release of inflammatory cytokines such as Interleukin 1 β (IL-1- β) and interleukin 18 (IL-18). Treatment of microglial cultures with LPS showed a significant increase in the expression of mRNA for NLRP3, which was completely blocked by combined treatment with LPS and agathisflavone, which was at control levels (Figure 6). The results indicate a general anti-inflammatory effect of agathisflavone on LPS-induced changes in microglia.

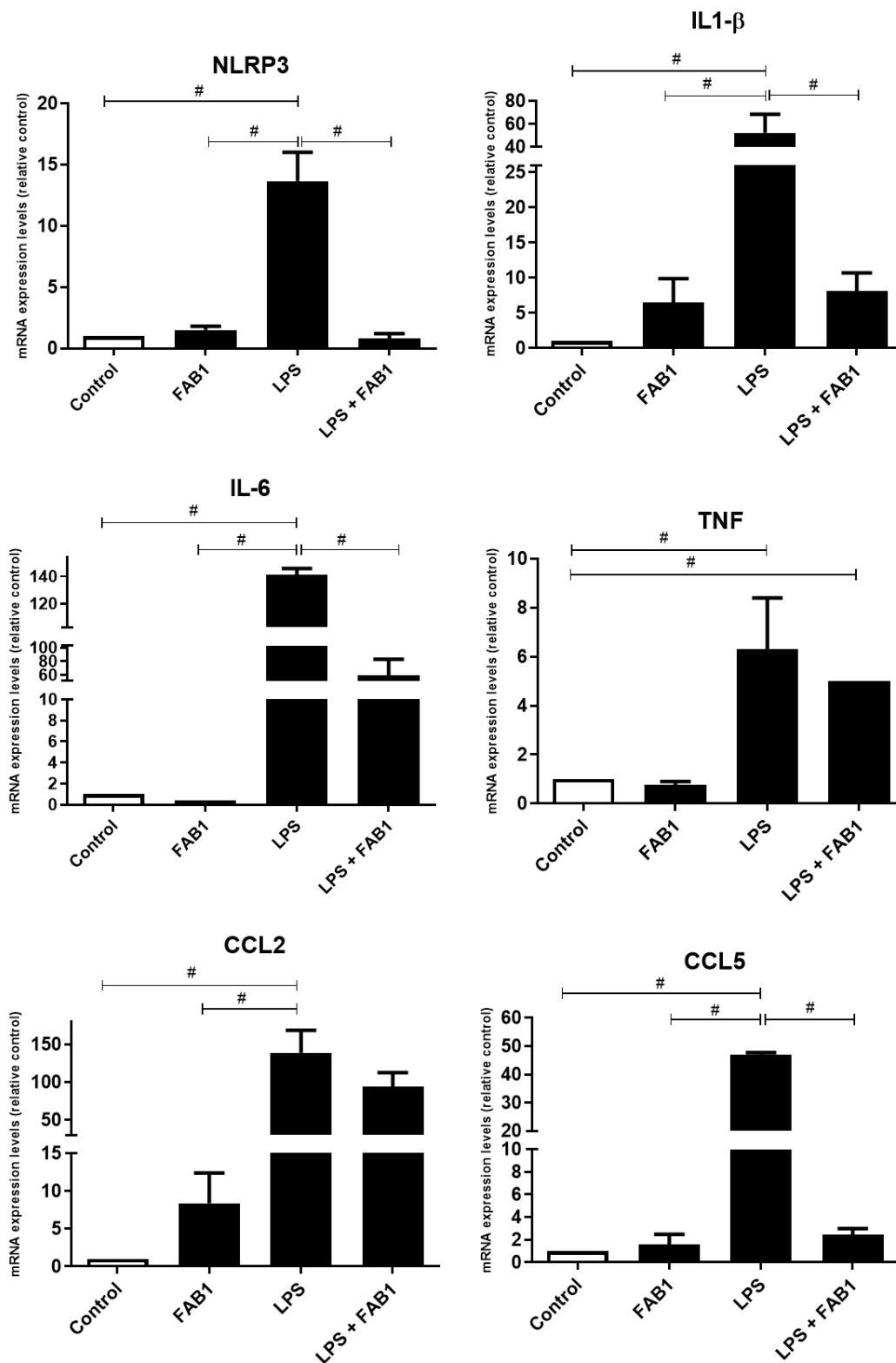


Figure 6. Effects of agathisflavone on inflammatory genes in LPS-treated microglia. Cultures of microglia were exposed to LPS (1 μ g/mL) and/or treated with 1 μ M agathisflavone (FAB1) for 24 h and RT-qPCR was performed on microglial cells to determine relative expression levels of mRNA for the component NLRP3 of the inflammasome complex, inflammatory cytokines IL1 β , IL6, and TNF, and the chemokines CCL2 and CCL5. Data presented as mean \pm SEM fold change relative to controls. Were tested for significance by one-way ANOVA; # $p < 0.05$ ($n = 3$).

3.4. Agathisflavone can Interact with NLRP3 Inflammasome

The results above demonstrated a highly potent dampening effect of agathisflavone on NLRP3 inflammasome and we, therefore, examined the potential interactions of agathisflavone in the NACHT domain of the NLRP3 inflammasome an important site for inflammasome ATPase activity required for its activation [15]. Docking analyses demonstrated the site of in silico interaction between these molecules (Figure 7A,B). The Gibbs free energy is used as a principle to analyze the spontaneity of bonds that occur in chemical reactions, the more negative the Gibbs free energy, the better the attraction between molecules. The binding between agathisflavone and the NACHT region of the NLRP3 of *Rattus novergicus* showed a Gibbs free energy value equivalent to -11.2 kcal/mol (Figure 7A). The NACHT domain of the NLRP3 of this species is composed of amino acids from position 218 to 534 and in it, we have the presence of two important motifs responsible for the activation of NLRP3, the motif walker A, and walker B. The interactions of agathisflavone in the NACHT domain of the species *Rattus novergicus* occurred through 22 interactions with the participation of 18 amino acids (Figure 7B,C), 11 van der Waal bonds, 2 conventional hydrogen bonds, 1 carbon–hydrogen bond, 2 Pi-cation bond, 3 Pi–Alkyl bond, 1 pi–donor hydrogen bond, 1 Pi–Sigma bond, and 1 Pi–Pi bond T-shaped (Figure 7C). Notably, we show that MCC950, a known inhibitor of NLRP3, also bound to the NACHT domain (Figure 7D,E), presenting a Gibbs-free energy equivalent to -9.8 kcal/mol with the participation of 15 amino acids, with 6 Van der Waal bonds, 5 conventional hydrogen bonds, 2 Pi-Cation bonds, 3 Alkyl bonds, 2 Pi–Alkyl bonds and 1 T-shaped Pi–Pi bond with MCC950 (Figure 7F). In addition, the interactions of equal amino acids between these two molecules are shown in Table 1.

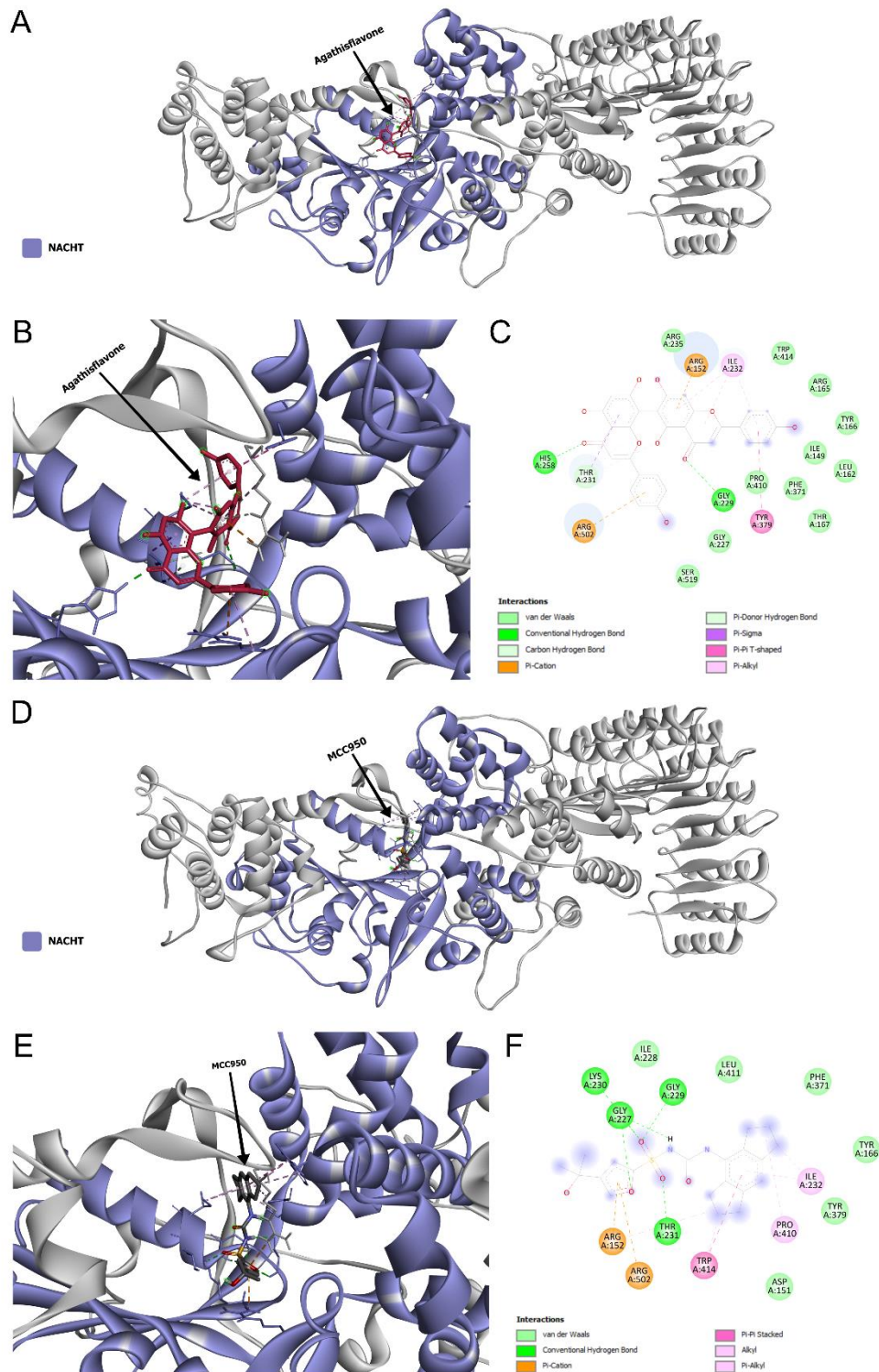


Figure 7. Agathisflavone and MCC950 interactions with the NACTH domain of NLRP3 inflammasome of *Rattus norvegicus*. **(A)** Visualization of complete NLRP3 structure with agathisflavone bounded. **(B)** Visualization of the NACTH region (in brown) with agathisflavone bounded. **(C)** 2D diagram showing amino acids and kinds of agathisflavone/NLRP3 interactions. **(D)** View of the complete NLRP3 structure linked to MCC950 (in red). **(E)** Visualization of the NACTH region (in brown) connected to MCC950. **(F)** 2D diagram demonstrating the amino acids and types of MCC950/NLRP3 interactions.

Table 1. Comparison of amino acids and types of interactions of NLRP3-agathisflavone and NLRP3-MCC950 binding (NLRP3 *Rattus norvegicus*).

Amino Acids	Bonds MCC950	Bonds Agathisflavone
ARG: 152	1 Pi cation	1 Van der Waals; 1 Alkyl
TYR: 166	1 Van der Waals	1 Van der Waals
GLY: 227	1 Van der Waals	3 conventional hydrogen
GLY: 229	1 conventional hydrogen	1 conventional hydrogen
THR: 231	1 hydrogen and carbon; 1 hydrogen pi-donor; 1 Pi-Sigma	1 conventional hydrogen
ILE: 232	3 Pi-Alkyl	1 Alkyl; 1 Pi-Alkyl
PHE: 371	1 Van der Waals	1 Van der Waals
TYR: 379	1 T-shaped pi-pi	1 Van der Waals
PRO: 410	1 Van der Waals	1 Alkyl
TRP: 414	1 Van der Waals	1 T-shaped pi-pi; 1 Pi-Alkyl
ARG: 502	1 Pi cation	1 Pi cation

Docking performed with agathisflavone in the NACHT domain of the NLRP3 inflammasome of *H. sapiens*, also demonstrated the site of in silico interaction between these molecules (Figure 8A,B). Notably, we show that the binding between agathisflavone and the NACHT region of NLRP3 presented a Gibbs free energy value equivalent to -10.6 kcal/mol. The interaction of agathisflavone in the NACHT domain occurred both in the Walker A motif, with 15 interactions, and in the Walker B motif, with 2 interactions. The result of these agathisflavone interactions with NACHT-NLRP3 was the total participation of 17 amino acids, with 6 van der Waal bonds, 12 conventional hydrogen bonds, 2 carbon and hydrogen bonds, 1 Pi-cation bond, 3 Pi-Alkyl bonds and 2 pi-donor hydrogen bonds (Figure 8C). The MCC950, a known inhibitor of NLRP3, and its inhibition is associated with interactions with the walker A motif of the NACHT domain. Our in silico analysis showed that MCC950 also bound to the A walker motif of the NACHT domain (Figure 8D,E), presenting a Gibbs free energy equivalent to -9.7 kcal/mol with the participation of 16 amino acids, with 5 Van der Waal bonds, 7 conventional hydrogen bonds, 1 Pi-Cation bond, 5 Alkyl bonds and 2 Pi-Alkyl bonds with the MCC950 (Figure 8F). The interactions of equal amino acids between these two molecules are shown in Table 2. These results show that both agathisflavone and MCC950 bound at sites very close to this domain, suggesting possible inhibition of NLRP3 by the flavonoid.

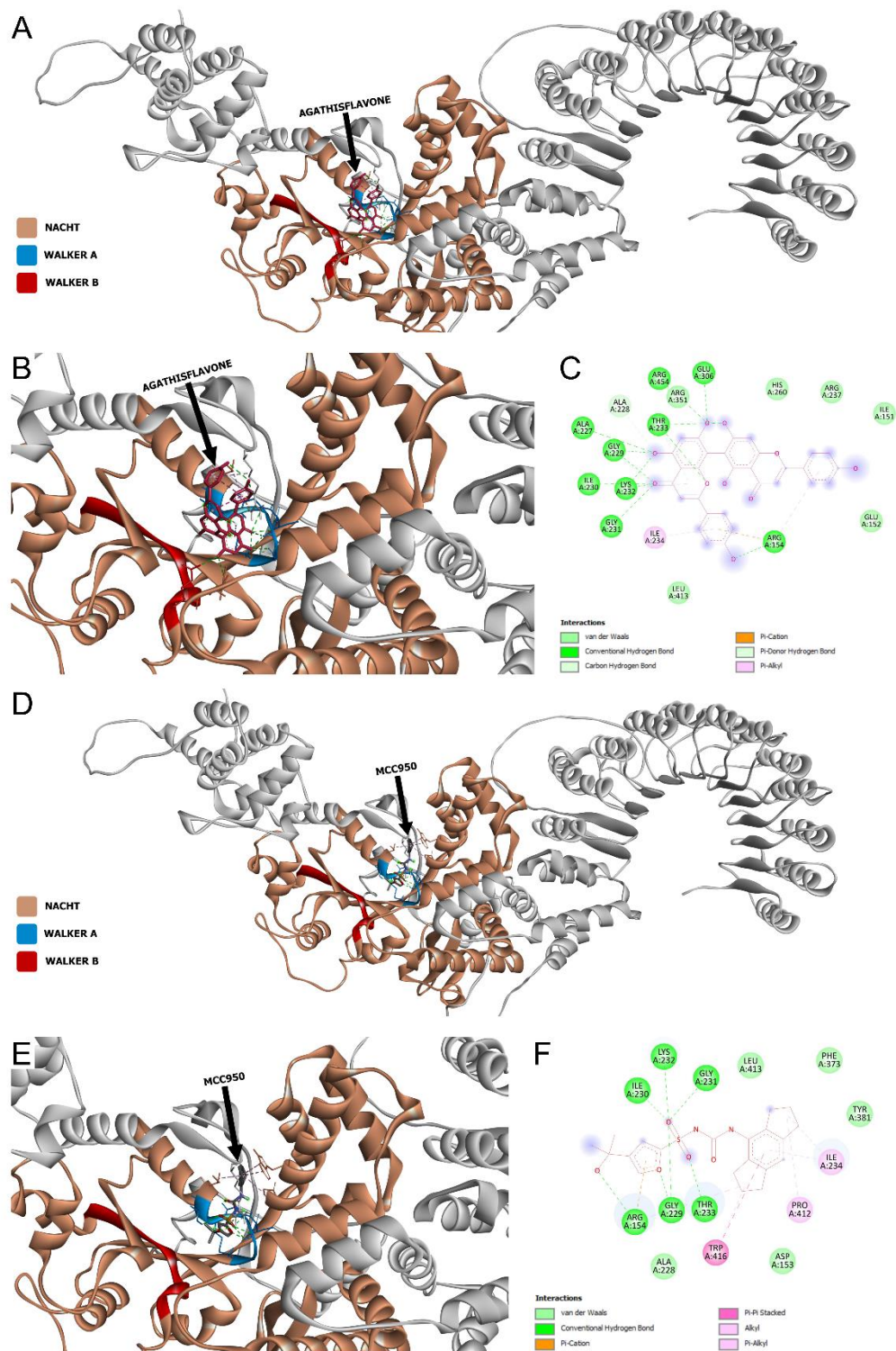


Figure 8. Agathisflavone and MCC950 interactions with the NACTH domain of NLRP3 inflammasome of *Homo sapiens*. **(A)** Visualization of complete NLRP3 structure with agathisflavone bounded. **(B)** Visualization of the NACTH region (in brown) with agathisflavone bounded. **(C)** 2D diagram showing amino acids and kinds of agathisflavone/NLRP3 interactions. **(D)** View of the complete NLRP3 structure linked to MCC950 (in red). **(E)** Visualization of the NACTH region (in brown) connected to MCC950. **(F)** 2D diagram demonstrating the amino acids and types of MCC950/NLRP3 interactions.

Table 2. Comparison of amino acids and types of interactions of NLRP3-agathisflavone and NLRP3-MCC950 binding (NLRP3 *Homo sapiens*).

Amino Acids	Bonds MCC950	Bonds Agathisflavone
ARG: 454	1 Van der Waal	1 conventional hydrogen
GLU: 306	1 Van der Waal	1 conventional hydrogen
ARG: 154	1 conventional hydrogen; 1 Pi-cation; 1 Alkyl	1 conventional hydrogen; 1 Pi-cation; 1 Hydrogen Pi-donor
LEU 413	1 Van der Waal	1 Van der Waal
ILE: 234	1 Alkyl; 1 Pi-Alkyl	1 Pi-Alkyl
GLY: 231	1 conventional hydrogen	2 conventional hydrogens; 1 Pi-Alkyl
LYS 232	1 conventional hydrogen	2 conventional hydrogens; 1 Pi-Alkyl
ILE: 230	1 conventional hydrogen	1 conventional hydrogen
GLY: 229	2 conventional hydrogens	2 conventional hydrogens
ALA: 228	1 Van der Waal	1 Hydrogen-carbon; 1 Hydrogen Pi-donor
THR: 233	2 conventional hydrogens	2 conventional hydrogens; 1 Hydrogen-carbon

3.5. Agathisflavone Modulates Microglia to a Neuroprotective Profile on LPS-Induced Toxicity

The results above demonstrate that agathisflavone has an overall anti-inflammatory effect on LPS-treated microglia. As already reported, LPS is known for its ability to activate microglia and promote damage to neurons, through its recognition by toll-like receptors (TLRs) present in the microglial membrane, specifically TLR4, and consequent activation of the NF κ B factor [16,17]. To determine whether the anti-inflammatory effects of agathisflavone on the microglial secretome are translated into neuroprotection, we determined the effects of microglial conditioned medium (MCM) on cultures of PC12 cells that had been differentiated into neurons with NGF, as confirmed by immunolabelling for β -tubulin III (Figure 8B). PC12 cells exposed to microglial conditioned medium (MCM) treated with vehicle (DMSO, controls), LPS (1 μ g/mL), agathisflavone (1 μ M), or both LPS and agathisflavone. The effects of MCM on PC12 cells were analyzed in terms of cell morphology by phase contrast microscopy (Figure 9A), and by immunocytochemistry for the neuronal marker β -tubulin III and apoptosis marker caspase-3 (Figure 9B). As shown in Figure 9A, PC12 cells exposed to MCM from controls (DMSO) or agathisflavone had a polarised morphology, with regular cell bodies and a network of long neurites. When exposed to MCM from LPS-treated microglia, PC12 cells displayed signs of cell damage, with swelling

of the cell somata, formation of membranous globular structures, and loss of cellular neurites (Figure 9A, some indicated by yellow arrows). On the other hand, when PC12 cells were exposed to MCM from microglia treated with combined LPS and agathisflavone, the typical differentiated PC12 morphology was observed, with preservation of the cellular neurite network (Figure 9A, some indicated by white arrows). Equivalent results were observed using the neuronal marker β -tubulin III, where PC12 cells extended complex networks of neurites in MCM from controls, and this was severely disrupted in PC12 cultures treated with MCM from LPS-treated microglia, whereas neurites were preserved, and cells appeared as in controls in MCM from microglia treated with LPS plus agathisflavone (Figure 9B). In addition, there was intense immunolabelling for the caspase-3 marker in MCM treated with LPS, and this was significantly reduced in MCM from LPS and agathisflavone, when compared to the control (Figure 9B,C). The results demonstrate a cytoprotective effect of the secretome from agathisflavone treated microglial cultures.

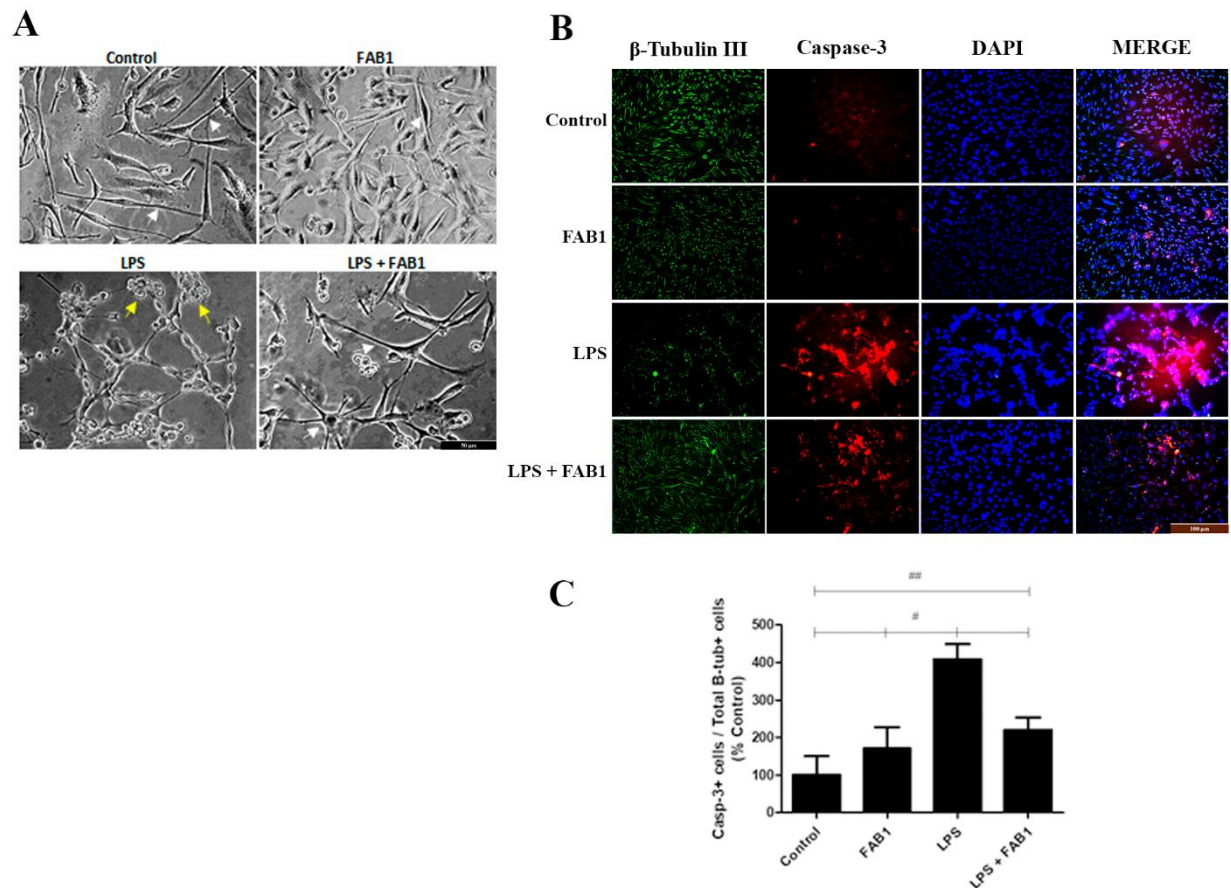


Figure 9. Agathisflavone has a neuroprotective effect on LPS-treated cells. PC12 cells were differentiated into neurons using NGF and treated with microglial conditioned medium (MCM) from microglial cultures treated with control vehicle (DMSO 0.01%), LPS (1 μ g/mL), agathisflavone (FAB1, 1 μ M) or combined LPS + FAB1. **(A)** Phase contrast microscopy of cells in the different treatment groups. In controls and FAB1 MCM cells had a typical neuronal morphology with multiple dendrites (white arrows), whereas cells appeared severely disrupted in MCM LPS (yellow arrows). Scale bars: 50 μ m. **(B)** Immunocytochemistry with the neuronal marker B-tubulin III (green) and caspase-3 (red) to detect apoptotic cells, counterstained with the nuclear marker DAPI (blue). Scale bars: 100 μ m. **(C)** Graph representing the proportion of cells double labeled with β -TubIII and caspase-3. Values are expressed as the mean \pm SEM (n = 3) and were tested for significance by one-way ANOVA test. (# or ## $p < 0.05$).

4. Discussion and conclusion

Microglia play an important role in defending the brain and repairing nervous tissue. In the injured or diseased brain, ramified microglia quickly change to an activated state, where they proliferate, migrate, change their morphology, express specific markers, release a variety of cytokines, and become phagocytic. In the present work, we used a model of LPS-induced neuroinflammation in primary cultures of microglia and demonstrated that biflavonoid agathisflavone modulates the microglial inflammatory response and promoted a neuroprotective inflammasome. In addition, we show that agathisflavone strongly interacts with the NACTH domain of NLRP3 inflammasome similar to the known inhibitor MCC950, suggesting this is an important mechanism of action of agathisflavone.

As shown previously, LPS induced a robust microglial activation, as characterized by morphological changes, increased Iba-1 immunolabelling and changes in their cytokine/chemokine profile. A doubling of the number of Iba-1 positive microglia and overall increased cellular viability determined by the MTT assay indicated that LPS induced microglial proliferation, consistent with previous studies showing that Iba1 is positively regulated in microglial cells activated by CNS-damaging stimuli, participating in the modulation and reorganization of the cytoskeleton actin, contributing to cell membrane wrinkling, phagocytosis and in cell migration [18–22]. A key finding is that treatment with agathisflavone significantly inhibited these LPS-induced microglial reactive changes, as determined by cell morphology, number, and viability, which were not significantly different from control cultures. These results demonstrate that agathisflavone modulates microglial activation and proliferation. Upregulation in the expression of Iba1 also suggests the presence of active microglial cells.

Another important effect observed in the present work was the changes in cell morphology and the expression of CD68 and CD206 proteins. As shown in our results, microglia in the presence of LPS showed a more amoeboid aspect, with shorter and thicker protractions, different from what was observed when the cells were exposed to the flavonoid, which showed a predominance of a multipolar and more branched phenotype. In addition, exposure to LPS induced an increase in CD68 expression and a reduction in CD206 expression and the percentage of CD206 positive cells, whereas, in LPS-stimulated cells treated with agathisflavone, there was an increase in CD206 expression, as well as an

increase in the percentage of CD206 positive cells, although CD68 expression remained significantly higher than in controls, suggesting a complex effect of agathisflavone on microglia. This is consistent with changes in the expression patterns of cytokines/chemokines. Following LPS treatment the morphological changes in microglia to an activated amoeboid phenotype corresponded to increased expression of the pro-inflammatory cytokines/mediators IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, CCL5, ROS, and NO [23,24]. These LPS-induced pro-inflammatory changes were completely inhibited by agathisflavone, with the exceptions of TNF α and CCL2 which were not reduced by agathisflavone, and IL-6, which was significantly reduced but remained higher than in controls. The results demonstrate that agathisflavone modulates LPS-induced microglial activation and promotes an overall anti-inflammatory phenotype.

Studies show that in the presence of harmful stimuli to brain tissue, such as LPS, microglia tend to assume a more amoeboid morphological profile, with retraction of its cell extensions and expression of cell surface molecules that recognize many of the inflammatory mediators present in the environment and that are associated with cell activation, migration, and proliferation. This morphological profile has been called by some authors as “amoeboid” microglia, resembling the so-called inflammatory profile of M1 macrophages, which is an oversimplification and does not adequately describe microglial activation states [5,7,25]. In inflammatory activation of microglia, studies show an increase in the expression of the CD68 marker [5,16,26]. CD68 is a transmembrane protein that has a molecular weight of 110 kDa, present in macrophages from various tissues and microglial cells in the CNS. The increase in CD68 expression appears to correlate with microglia activation, and its expression is regulated in response to various inflammatory stimuli, including the LPS toxin. The CD68 protein has a dotted distribution in resting microglial cell processes, whereas in activated cells of amoeboid morphology, its distribution becomes more evident [18,26].

Another activation state in which the microglia can also show amoeboid morphology is the M2a profile. In this case, the cell assumes anti-inflammatory characteristics, expressing on its surface markers such as arginase-1 (Arg-1), CD206, CD36, and CD163, as well as synthesizing cytokine IL-10 [16,24,27,28]. The increase in CD206 expression shown in our work corroborates the anti-inflammatory effect of flavonoids found by other authors [5,16,29]. The CD206

marker is a type C mannose and lectin receptor, expressed on the surface of macrophages/microglia where it acts as a pattern recognition receptor (PRR), helping these cells in the mechanisms of tissue repair, inflammation resolution, induction of immune tolerance and protection against excessive inflammation [30,31]. In this sense, we can infer the ability of agathisflavone to modulate the response to damage induced by LPS, for an anti-inflammatory profile.

In the present study, we also evaluated the antioxidant effect of agathisflavone, through the glutathione depletion assay, NO dosage, and the DPPH elimination test. Reduced glutathione (GSH) has an antioxidant action in the brain, and its inhibition leads to the secretion of toxic products into central nervous system (CNS) cells, which may be related to neurological disorders [14,32]. Here, agathisflavone reduced GSH depletion in LPS-stimulated microglial cells. Lee et al. [14] showed in an in vitro model that the inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase (BSO) induced a neuroinflammatory response in microglia and astrocyte cell lines, due to reduced intracellular levels of GSH. Work has suggested that oxidative stress leads to the active secretion of intracellular GSH in CNS cells, and that GSH depletion in neuroinflammation models leads to the activation of microglia, astrocytes, and consequent neuronal death [33,34].

Another important mediator in the neuroinflammatory process is nitric oxide (NO). In neuroinflammatory-related diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, activated glial cells increased the synthesis and the release of NO and other inflammatory mediators into the tissue microenvironment. In the present work, we observed that the flavonoid agathisflavone was able to negatively modulate NO synthesis. Studies have shown that NO is synthesized and released by activated microglia under the action of inflammatory stimuli, such as LPS, thus performing a neurotoxic action [5,35]. In activated microglia, in addition to the secretion of pro-inflammatory cytokines, there is also a generation of reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), and reactive nitrogen species (RNS). This set of mediators produced in microglia activation contributes to oxidative stress and neurotoxicity [36,37]. In a previous study carried out by our research group, the effect of agathisflavone in reducing nitric oxide production was shown in the primary coculture of neurons and glial cells [6]. Negative

modulation of NO in microglia contributes to the reduction of neuroinflammation, consequently playing a neuroprotective role [36].

In the evaluation of the antioxidant properties, we showed that agathisflavone performed high activity in the scavenging of free radicals in a dose-dependent manner. Phenolic compounds are known for their antioxidant capacity by scavenging free radicals and reactive oxygen species [38,39]. Methanolic extracts from branches of *Juniperus macrocarpa*, which have a high amount of biflavonoids such as agathisflavone and amentoflavone, and show a high DPPH-reducing potential, showing inhibition of up to 80.23%, at a concentration of 1 mg/mL, when compared with ascorbic acid (87.29%), used as a reference [40]. Furthermore, studies have shown that molecules that have free hydroxyl groups, such as agathisflavone, are strongly linked with antioxidant activity through DPPH free radical stabilization by hydrogen radical donation [41].

In addition to the effects observed in microglial proliferation and morphology, agathisflavone also had an immunomodulatory effect, through the regulation promoted in the expression of mRNA of inflammatory mediators. In the present study, we show that agathisflavone reduced the expression of IL-6, IL1- β , TNF, CCL2, and CCL5 as well as the NLRP3 inflammasome complex. Many studies have also shown that polyphenols, especially flavonoids, are molecules that have interesting biological effects, including anti-inflammatory and neuroprotective effects [5,6,16,42–50]. In a study carried out by Monique et al. [6] it was shown that agathisflavone, similarly to our work, reduced the expression of inflammatory cytokines, such as IFN γ , TNF α , IL1 β in LPS-stimulated microglia culture. In another study by Souza et al. [7], it was also shown that the flavonoid agathisflavone reduced the expression of the inflammatory cytokines IL-6, IL1 β , and TNF, induced by glutamate in a model of neuron-glia co-cultures. Muhammad et al. [51], in a study carried out with BV-2 microglial cells stimulated with LPS, showed that the flavonoid hesperetin, a member of the subclass flavanone, which is found in citrus fruits such as oranges, significantly reduced levels of mRNA expression and production for the cytokines TNF α and IL1 β , as well as reduced the production of IL-6. In another work carried out with BV-2 microglia stimulated with lipopolysaccharide (LPS), it was shown that pre-treatment with agathisflavone (5–20 μ M) produced a significant reduction in the release of TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO and prostaglandin (PG) E2 [52].

An important feature of neurodegenerative processes is the increase in the production and release of inflammatory mediators, such as the cytokines IL-6, TNF, IL1 β , and IL-18. In this process, there is a strong participation of astrocytes and microglia, in which, when activated as the result of the harmful stimulus the production of the described inflammatory mediators is induced, triggering, among others, a chronic inflammatory response and contributing to the progression of neurodegeneration. Many of these cytokines have their expression regulated by the signaling pathway such as that of the mitogen-activated protein kinase (MAPK), and studies have suggested that flavonoids may act by inhibiting this signaling pathway, by suppressing ERK1/2 phosphorylation and blocking activation by NF-kB [49–51]. Considering the expression of IL1 β , studies have suggested that flavonoids interfere by blocking the activation of caspase-1 or in the organization of the NLRP3 inflammasome. The NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex composed of an NLRP3 sensor, an ASC/PYCARD adapter, and caspase-1, which is essential for the activation of the cytokines IL1 β and IL-18. In this sense, interferences in the organization of this protein complex consequently affect the activation of the inflammatory mediators IL1 β and IL-18 [50].

As shown in our work, agathisflavone reduced the expression of the mRNA of NLRP3 inflammasome, thus suggesting that the tested flavonoid also interferes with the assembly of the inflammasome complex. In silico analysis showed that agathisflavone can interact with the NACHT domain, an essential site for NLRP3 activation, this interaction occurs in a similar way to the inhibitor of this molecule, MCC950. The NLRP3 sensor protein contains two motifs in the NACHT domain that are important for its ATPase activity, the Walker A motif for ATP binding and the Walker B motif required for ATPase activity [15]. Functionally, the presence of ATP has been shown to activate the complex and the ATPase activity of the Walker B motif inactivates NLRP3 [53,54]. Both motifs cited are highly conserved and mutations in its structure can compromise all inflammasome functions, indicating a key role of this region in the activation of the complex [15]. Given the closed conformation of the NACHT domain, a conformational change is necessary for the exchange of ADP in ATP and consequent activation of NLRP3 with the subsequent assembly of the NLRP3 inflammasome complex. It was observed that MCC950 can prevent the opening

of the NACHT domain, through crucial links with Walker motifs A and B, stabilizing its closed form, that is, the inactive form of this domain [55]. This study shows through in silico analysis that agathisflavone can bind to these motifs as well as MCC950 and may interfere with the activation of the NLRP3 sensor protein, a key molecule to initiate the assembly of the NLRP3 inflammasome complex, which may be related to the control of mRNA expression for NLRP3 after flavonoid treatment.

In the present work, we also indirectly evaluated the neuroprotective effect of agathisflavone in a model of neuronal cells obtained from the differentiation of cells of the PC12 strain. These cells, after being differentiated, were exposed to microglia conditioned medium. We observed that agathisflavone was able to preserve or restore morphological integrity as well as promote an increase in cells positive for β -tubulin III, and a reduction of caspase-3 positive cells. Class III β -tubulin is a protein present in the structural organization of neuronal cell microtubules [6,56–58]. Caspase-3 is a protease present in cells as an inactive proenzyme, which, when activated, is essential to the death process by apoptosis, through the specific cleavage of many important cellular proteins [59,60]. However, a study suggests that caspase-3 activation can also mediate non-apoptotic neuronal functions, such as differentiation of neural stem cells and consequent neurogenesis, as demonstrated in an in vitro model of neurospheres clonally derived from the striatum of murine embryos [61]. In this sense, our work shows that the reduction of caspase-3 positive cells may be associated with the ability of the flavonoid evaluated to reduce neuronal cell death induced by LPS.

As previously discussed, many studies demonstrate that polyphenolic compounds are known for their biological antioxidant, neuroprotective and cognitive properties. In studies carried out by our group, the neuroprotective effect of the flavonoid agathisflavone has been shown. Souza et al. [7], for example, showed in primary neuron-glia co-culture, that treatment with the flavonoid agathisflavone promoted a neuroprotective effect against glutamate-mediated excitotoxicity as well as favoring an increase in the number of neurons through activation of estrogen receptors. In another study, Almeida et al. [6], also showed in neuron-glia co-culture obtained from the cerebral hemisphere of Wistar rats, that agathisflavone protected neurons from the inflammatory damage induced by LPS and IL-1 β , as well as increasing the overall number of positive

neurons for β -tubulin III and reducing of positive cells caspase-3, thus indicating, in addition to its neuroprotective effect, a possible neurogenic effect. In addition, studies have also shown the neurogenic effect of polyphenolic compounds in the hippocampus region. Kim et al. [62], for example, demonstrated in neural progenitor cells and in histological sections of the hippocampus of adult mice, that polyphenol curcumin was able to stimulate hippocampal neurogenesis and increase neural plasticity and tissue repair.

The effects observed in this study may be associated with the profile of secretome present in the conditioned medium from the microglia when treated with the flavonoid. As already discussed here, microglial cells exposed to harmful stimuli are induced to synthesize and secrete inflammatory mediators, and on the other hand, when treated with polyphenolic molecules, such as flavonoids, they can be induced to synthesize and secrete anti-inflammatory immune mediators in the environment. These molecules or mediators can be free in the microenvironment or inside extracellular vesicles (EVs), known as exosomes, and play their role in intercellular communication [63,64]. According to the literature, intercellular communication, such as that which occurs between neurons and glial cells, can be mediated through intercellular contact, through the action of molecules synthesized and secreted in the medium, or through EVs. The cells of the nervous system secrete EVs, which potentially transport proteins and RNA molecules (micro-RNAs and messenger RNAs), from one cell to another, contributing to signaling and the ability to modulate gene expression and to modify the phenotype of the cell target [63,65]. In microglia, for example, studies have shown the role of exosomes in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. These vesicles can transport and release pathogenic proteins such as the β -amyloid peptide and other inflammatory signals that contribute to the regulation and expression of pro-inflammatory genes such as IL-1 β , IL-6, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the recipient microglia [66,67].

The results present in this work clarify the role of the anti-inflammatory response in microglia induced by agathisflavone with its neuroprotective action, since agathisflavone down-regulates cytokines, cell surface markers and reactive species associated with pro-inflammatory microglia profile and conditioned medium from agathisflavone treated microglia is protective for PC12 cells. Thus,

the results presented here reinforce the neuroimmunomodulatory and neuroprotective role of this flavonoid suggesting its potential as an adjuvant agent in the prevention and treatment of neurodegenerative disorders.

Author Contributions: Conceptualization, B.L.d.S., M.d.F.D.C., V.D.A.d.S., A.M.B. and S.L.C.; Methodology, B.L.d.S., C.C.d.S., J.R.P.S., K.C.d.S., J.V.R.d.O., G.S.P., F.M.d.A. and J.M.D.; Formal analysis, B.L.d.S., C.C.d.S., J.R.P.S., A.M.B. and S.L.C.; Investigation, B.L.d.S. and K.C.d.S.; Resources, A.M.B.; Data curation, B.L.d.S., V.D.A.d.S. and S.L.C.; Writing—original draft, B.L.d.S., C.C.d.S., J.R.P.S., J.V.R.d.O., G.S.P., F.M.d.A., J.M.D. and S.L.C.; Writing—review & editing, A.M.B.; Visualization, M.d.F.D.C.; Project administration, S.L.C.; Funding acquisition, S.L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Foundation for Research Support of the State of Bahia (Process No. APP 0107/2016), the Coordination of Personnel Improvement of Higher Level (CAPES, Process PGCi No. 88881.117666/2016-01, and Ph.D. fellowship for BLS Process No. 88882.452904/2019-01), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Research Fellowship to SLC Process No. 307539/2018-0, INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection—INCT-EN, BR).

Institutional Review Board Statement: The experiments involving animals were carried out in accordance with the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Health Sciences Institute of the Federal University of Bahia (CEUA protocol No. 6731220818).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank the Postgraduate Program in Immunology and the Laboratory of Neurochemistry and Cell Biology of the Federal University of Bahia.

Conflicts of Interest: AMB is a shareholder in the company 'GliaGenesis Ltd.'. Otherwise, the authors report no conflicts of interest, including personal or financial.

5. References

1. Kim, S.H.; Smith, C.J.; Van Eldik, L.J. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol. Aging* **2004**, *25*, 431–439.
2. Ye, Y.; Jin, T.; Zhang, X.; Zeng, Z.; Ye, B.; Wang, J.; Zhong, Y.; Xiong, X.; Gu, L. Meisoindigo Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Regulating Microglia/Macrophage Polarization via TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *16*, 553.
3. Shen, R.; Deng, W.; Li, C.; Zeng, G. A natural flavonoid glucoside icariin inhibits Th1 and Th17 cell differentiation and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *24*, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.015>.
4. da Silva, A.B.; Cerqueira Coelho, P.L.; Amparo, J.A.O.; de Almeida Carneiro, M.M.A.; Borges, J.M.P.; dos Santos Souza, C.; de Fátima Dias Costa, M.; Mecha, M.; Rodriguez, C.G.; da Silva, V.D.A.; et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *274*, 89–99.
5. de Almeida, M.M.A.; Pieropan, F.; de Mattos Oliveira, L.; Dos Santos Junior, M.C.; David, J.M.; David, J.P.; Da Silva, V.D.A.; Dos Santos Souza, C.; Costa, S.L.; Butt, A.M. The flavonoid agathisflavone modulates the microglial neuroinflammatory re-sponse and enhances remyelination. *Pharm. Res.* **2020**, *159*, 104997.
6. de Almeida, M.M.A.; Souza, C.D.S.; Dourado, N.S.; da Silva, A.B.; Ferreira, R.S.; David, J.M.; David, J.P.; Costa, M.F.D.; da Silva, V.D.A.; Butt, A.M.; et al. Phytoestrogen Agathisflavone Ameliorates Neuroinflammation-Induced by LPS and IL-1 β and Protects Neurons in Cocultures of Glia/Neurons. *Biomolecules* **2020**, *10*, 562. <https://doi.org/10.3390/biom10040562>.
7. Souza, C.D.S.; Grangeiro, M.S.; Pereira, E.P.L.; dos Santos, C.C.; da Silva, A.B.; Sampaio, G.P.; Figueiredo, D.D.R.; David, J.M.; David, J.P.; da Silva, V.D.A.; et al. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology* **2018**, *65*, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001>.
8. Mecha, M.; Iñigo, P.M.; Mestre, L.; Hernangómez, M.; Borrell, J.; Guaza, C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protoc. Exch.* **2011**. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.218>.
9. Sierra-Fonseca, J.A.; Najera, O.; Martinez-Jurado, J.; Walker, E.M.; Varela-Ramirez, A.; Khan, A.M.; Miranda, M.; Lamango, N.S.; Roychowdhury, S. Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G β γ -microtubule interaction. *BMC Neurosci.* **2014**, *15*, 132. <https://doi.org/10.1186/s12868-014-0132-4>.
10. Zhang, C.-C.; Yin, X.; Cao, C.-Y.; Wei, J.; Zhang, Q.; Gao, J.-M. Chemical constituents from *Hericium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5078–5082. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.016>.
11. Mendes, C.C.; Bahia, M.V.; David, J.M.; David, J.P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 205–207. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(99\)00145-8](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00145-8).
12. Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell

- kill. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).
13. Sims, N.R.; Nilsson, M.; Muyderman, H. Mitochondrial Glutathione: A Modulator of Brain Cell Death. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2004**, *36*, 329–333. <https://doi.org/10.1023/b:jobb.0000041763.63958.e7>.
 14. Lee, D.C.; Rizer, J.; Selenica, M.-L.B.; Reid, P.; Kraft, C.; Johnson, A.; Blair, L.; Gordon, M.N.; Dickey, C.A.; Morgan, D. LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 56. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-56>.
 15. MacDonald, J.A.; Wijekoon, C.P.; Liao, K.-C.; Muruve, D.A. Biochemical and structural aspects of the ATP-binding domain in inflammasome-forming human NLRP proteins. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 851–862. <https://doi.org/10.1002/iub.1210>.
 16. Dourado, N.S.; Souza, C.D.S.; de Almeida, M.M.A.; da Silva, A.B.; dos Santos, B.L.; Silva, V.D.A.; De Assis, A.M.; da Silva, J.S.; Souza, D.O.; Costa, M.F.D.; et al. Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in in vitro Models of Neuroinflammation Associated With Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 119. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00119>.
 17. Verkhratsky, A.; Butt, A. *Glial Physiology and Pathophysiology*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118402061>.
 18. Korzhhevskii, D.E.; Kirik, O.V. Brain microglia and microglial markers. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2016**, *46*, 284–290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>.
 19. Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.* **1998**, *57*, 1–9.
 20. Ohsawa, K.; Imai, Y.; Kanazawa, H.; Sasaki, Y.; Kohsaka, S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3073–3084. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>.
 21. Ohsawa, K.; Imai, Y.; Sasaki, Y.; Kohsaka, S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>.
 22. Mori, I.; Imai, Y.; Kohsaka, S.; Kimur, Y. Upregulated Expression of Iba1 Molecules in the Central Nervous System of Mice in Response to Neurovirulent Influenza A Virus Infection. *Microbiol. Immunol.* **2000**, *44*, 729–735.
 23. Nakagawa, Y.; Chiba, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.06.010>.
 24. Wolf, S.A.; Boddeke, H.W.G.M.; Kettenmann, H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>.
 25. Kettenmann, H.; Hanisch, U.; Noda, N.; Verkhratsky, A. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
 26. Song, L.; Lee, C.; Schindler, C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1542–1550. <https://doi.org/10.1194/jlr.m015412>.
 27. Cunha, C.; Gomes, C.; Vaz, A.R.; Brites, D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 6986175. <https://doi.org/10.1155/2016/6986175>.

28. Nayak, D.; Roth, T.L.; Mcgaver, D.B. Microglia Development and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 367–40.
29. Wang, S.; Jing, H.; Yang, H.; Liu, Z.; Guo, H.; Chai, L.; Hu, L. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *164*, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.042>.
30. Suzuki, Y.; Shirai, M.; Asada, K.; Yasui, H.; Karayama, M.; Hozumi, H.; Furuhashi, K.; Enomoto, N.; Fujisawa, T.; Nakamura, Y.; et al. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13129. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31565-5>.
31. Xu, Z.-J.; Gu, Y.; Wang, C.-Z.; Jin, Y.; Wen, X.-M.; Ma, J.-C.; Tang, L.-J.; Mao, Z.-W.; Qian, J.; Lin, J. The M2 macrophage marker CD206: A novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* **2019**, *9*, 1683347. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1683347>.
32. Song, J.; Kang, S.M.; Lee, W.T.; Park, K.A.; Lee, K.M.; Lee, J.E. Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. *Exp. Neurobiol.* **2014**, *23*, 93–103. <https://doi.org/10.5607/en.2014.23.1.93>.
33. Hirrlinger, J.; Schulz, J.B.; Dringen, R. Glutathione release from cultured brain cells: Multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *69*, 318–326. <https://doi.org/10.1002/jnr.10308>.
34. Schulz, J.B.; Lindenau, J.; Seyfried, J.; Dichgans, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4904–4911.
35. Yang, Y.X.; Zheng, L.T.; Shi, J.J.; Gao, B.; Chen, Y.K.; Yang, H.C.; Chen, H.L.; Li, Y.C.; Zhen, X.C. Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1222–1227.
36. Aalinkeel, R.; Mangum, C.S.; Abou-Jaoude, E.; Reynolds, J.L.; Liu, M.; Sundquist, K.; Parikh, N.U.; Chaves, L.D.; Mammen, M.J.; Schwartz, S.A.; et al. Galectin-1 Reduces Neuroinflammation via Modulation of Nitric Oxide-Arginase Signaling in HIV-1 Transfected Microglia: A Gold Nanoparticle-Galectin-1 “Nanoplex” a Possible Neurotherapeutic? *J. Neuroimmune Pharm.* **2017**, *12*, 133–151.
37. Tse, J.K.Y. Gut Microbiota, Nitric Oxide, and Microglia as Prerequisites for Neurodegenerative Disorders. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 1438–1447. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00176>.
38. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
39. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 67–202. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00298-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00298-x).
40. Gök, H.N.; Orhan, N.; Özüpek, B.; Pekacar, S.; Selvi, Ş.N.; Orhan, D.D. Standardization of *Juniperus macrocarpa* Sibth. & Sm. and *Juniperus excelsa* M. Bieb. Extracts with Carbohydrate Digestive Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities. *Iran. J. Pharm. Res.* **2021**, *20*, 441–455.
41. Parcheta, M.; Świsłocka, R.; Orzechowska, S.; Akimowicz, M.; Choińska, R.; Lewandowski, W. Recent Developments in Effective Antioxidants: The

- Structure and Antioxidant Properties. *Materials* **2021**, *14*, 1984. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>.
42. Coelho, P.L.C.; Amparo, J.A.O.; Silva, A.B.; Silva, K.C.; Souza, S.B.; Barbosa, P.R.; Lopes, G.P.F.; Costa, S.L. Apigenin from *Croton betulaster* Müll restores the immune profile of microglia against glioma cells. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 3191–3202. <https://doi.org/10.1002/ptr.6491>.
 43. da Silva, A.B.; Coelho, P.L.C.; Oliveira, M.D.N.; Oliveira, J.L.; Amparo, J.A.O.; da Silva, K.C.; Soares, J.R.P.; Pitanga, B.P.S.; Souza, C.; Lopes, G.P.D.F.; et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *85*, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.003>.
 44. Raza, S.S.; Khan, M.M.; Ahmad, A.; Ashafaq, M.; Islam, F.; Wagner, A.P.; Safhi, M.M. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-kappaB signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience* **2013**, *230*, 157–171.
 45. Sabogal-Guáqueta, A.M.; Munoz-Manco, J.I.; Ramírez-Pineda, J.R.; Lamprea-Rodriguez, M.; Osorio, E.; Cardona-Gómez, G.P. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* **2015**, *93*, 134–145.
 46. Singh, D.P.; Chopra, K. Flavocoxid, dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, exhibits neuroprotection in rat model of ischaemic stroke. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2014**, *120*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.006>.
 47. Wang, S.-W.; Wang, Y.-J.; Su, Y.-J.; Zhou, W.-W.; Yang, S.-G.; Zhang, R.; Zhao, M.; Li, Y.-N.; Zhang, Z.-P.; Zhan, D.-W.; et al. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology* **2012**, *33*, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.003>.
 48. Zhang, F.; Li, F.; Chen, G. Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. *Neurol. Sci.* **2014**, *35*, 583–588. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1566-7>.
 49. Zhang, T.; Su, J.; Guo, B.; Wang, K.; Li, X.; Liang, G. Apigenin protects blood-brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 79–87.
 50. Zhang, X.; Wang, G.; Gurley, E.C.; Zhou, H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS ONE*, **2014**, *9*, e107072.
 51. Muhammad, T.; Ikram, M.; Ullah, R.; Rehman, S.U.; Kim, M.O. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling. *Nutrients* **2019**, *11*, 648.
 52. Velagapudi, R.; Ajileye, O.O.; Okorji, U.; Jain, P.; Aderogba, M.A.; Olajide, O.A. Agathisflavone isolated from *Anacardium occidentale* suppresses SIRT1-mediated neuroinflammation in BV2 microglia and neurotoxicity in APPSwe-transfected SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Res.* **2018**, *32*, 1957–1966. <https://doi.org/10.1002/ptr.6122>.
 53. Duncan, J.A.; Bergstralh, D.T.; Wang, Y.; Willingham, S.B.; Ye, Z.; Zimmermann, A.G.; Ting, J.P.-Y. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8041–8046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611496104>.
54. Coll, R.C.; Hill, J.R.; Day, C.J.; Zamoshnikova, A.; Boucher, D.; Massey, N.L.; Chitty, J.; Fraser, J.A.; Jennings, M.P.; Robertson, A.A.B.; et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 556–559. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>.
 55. Dekker, C.; Mattes, H.; Wright, M.; Boettcher, A.; Hinniger, A.; Hughes, N.; Kapps-Fouthier, S.; Eder, J.; Erbel, P.; Stiefl, N.; et al. Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 167309.
 56. Brambilla, R.; Bracchi-Ricard, V.; Hu, W.H.; Frydel, B.; Bramwell, A.; Karmally, S.; Green, E.J.; Bethea, J.R. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 145–156.
 57. Owens, T. Toll-Like Receptors in Neurodegeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2009**, *336*, 105–120. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00549-7_6.
 58. Okun, I.; Balakin, K.; Tkachenko, S.; Ivachtchenko, A. Caspase activity modulators as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 322–341. <https://doi.org/10.2174/187152008783961914>.
 59. D'Amelio, M.; Cavallucci, V.; Cecconi, F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 1104–1114. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.180>.
 60. Porter, A.; Jänicke, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>.
 61. Fernando, P.; Brunette, S.; Megeney, L.A. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase-3 activity. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1671–1673. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2981fje>.
 62. Kim, S.J.; Son, T.G.; Park, H.R.; Park, M.; Kim, M.S.; Kim, H.S.; Chung, H.Y.; Mattson, M.P.; Lee, J. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14497–14505. <https://doi.org/10.1074/jbc.m708373200>.
 63. Frühbeis, C.; Fröhlich, D.; Kuo, W.P.; Krämer-Albers, E.-M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 182. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00182>.
 64. Frühbeis, C.; Fröhlich, D.; Krämer-Albers, E.-M. Emerging roles of exosomes in neuron–glia communication. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>.
 65. Brites, D. Regulatory function of microRNAs in microglia. *Glia* **2020**, *68*, 1631–1642. <https://doi.org/10.1002/glia.23846>.
 66. Bellingham, S.A.; Guo, B.B.; Coleman, B.M.; Hill, A.F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 124.
 67. Verderio, C.; Muzio, L.; Turola, E.; Bergami, A.; Novellino, L.; Ruffini, F.; Riganti, L.; Corradini, I.; Francolini, M.; Garzetti, L.; et al. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* **2012**, *72*, 610–624. <https://doi.org/10.1002/ana.23627>.
 68. Blois, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.

5.0 CAPÍTULO 2: artigo científico 2: O flavonóide agatisflavona modula resposta inflamatória e regula miR146a e miR155 em microglia humana estimulada com β -amilóide.

Autores: Balbino Lino dos Santos ^{1,2}, Cleonice Creusa dos Santos ¹, Karina C. da Silva ¹, Juciele Valeria R. de Oliveira ¹, Carolina Kymie Vasques Nonaka ^{3,4,5}, Bruno Solano de Freitas Souza ^{3,4,5}, Maria de Fátima D. Costa ¹, Jorge Mauricio David ⁶, Victor Diogenes A. da Silva ¹, Arthur M. Butt ⁷ and Silvia Lima Costa ¹

1. Laboratory of Neurochemistry and Cellular Biology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon S/N, Salvador 40231-300, Brazil;

2. College of Nursing, Federal University of Vale do São Francisco, Petrolina 56304-917, Pernambuco, Brazil

3. Center of Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, BA CEP 41253-190, Brazil.

4. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador 40296-710, Brasil

5. Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro 20000-000, Brasil

6. Department of General and Inorganic Chemistry, Institute of Chemistry, University Federal of Bahia, Salvador 40170-110, Brazil;

7. School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth PO1 2UP, UK.

RESUMO

O controle da ativação microglial e do processo neuroinflamatório são estratégias que têm sido investigadas no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas (NDD). A agatisflavona, um biflavonoide purificado das folhas da *Cenostigma pyramidale* (Tul.), tem demonstrado propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras em modelos *in vitro* e *in vivo* de NDD. Aqui, nós investigamos em células microgliais humanas, os efeitos da agatisflavona em modular expressão de microRNAs e mediadores inflamatórios, após estímulo inflamatório com oligômeros de β -amilóide. Para isso, culturas de microglia humanas da linhagem C20 foram expostas a oligômeros do peptídeo β -amilóide (500 nM) por 4 h ou a lipopolissacarídeo (LPS, 1 μ g/mL) por 24 h e então tratadas ou não com agatisflavona (1 μ M) por 24 h. Observamos que o β -amilóide e o LPS induziram as culturas de microglia a assumir um estado inflamatório ativado, com aumento na expressão de miR-146a e miR-155 e dos mediadores inflamatórios IL1- β , IL-6 e NOS2. No entanto, nas células expostas ao dano inflamatório e tratadas com agatisflavona, observamos redução significativa na concentração de miR146a e miR-155, bem como das citocinas inflamatórias avaliadas. Observamos também nas células estimuladas apenas com β -amilóide, um aumento na relação das proteínas sinalizadoras p-STAT3/STAT3, e nas células estimuladas com β -amilóide e tratadas com flavonoide, houve redução na relação p-STAT3/STAT3. Assim, estes dados reforçam o efeito antiinflamatória de agatisflavona destacando seu potencial na regulação de miRNAs associados a neuroinflamação. Estes

resultados fortalecem o potencial deste flavonoide como uma molécula promissora para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: agatisflavona, microglia humana, miRNAs, efeito antiinflamatório.

5.1. Introdução

As doenças neurodegenerativas (DND) são caracterizadas pela morte neuronal progressiva no sistema nervoso central, com consequente comprometimento das funções motoras e cognitivas, como é o caso da doença de Alzheimer (DA). A ativação microglial para um perfil pró-inflamatório é crucial para o processo de neurotoxicidade e progressão da neurodegeneração. Uma vez ativada, a microglia se torna responsiva aos estímulos danosos, assumindo geralmente uma morfologia amebóide e passa a expressar citocinas e quimiocinas inflamatórias e outros mediadores envolvidos na regulação da neuroinflamação como os microRNAs, característicos do estado clássico de ativação microglial M1 ou pró-inflamatório, apesar deste conceito clássico estar passando por questionamentos na comunidade científica, devido a dinamicidade do processo de ativação microglial nas variadas situações patológicas e devido a heterogeneidade de propriedades que podem ser adquiridas por estas células quando ativadas (ABUBAKAR *et al.*, 2022; DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; BISPO *et al.*, 2017; WOLF *et al.*, 2017; MERAZ-RIOS *et al.*, 2013; JUNN & MOURADIAN, 2012; VERKHRATSKY & BUTT, 2007; VILHARDT, 2005).

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA endógenas, curtas e não codificantes que atuam como importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, pareando suas bases com o mRNA alvo. Nesse pareamento, os miRNAs se ligam à porção 3'-UTR de seus mRNAs alvo levando a uma diminuição na expressão das proteínas alvo por degradação ou repressão da tradução do mRNA (MEDRANO-JIMÉNEZ *et al.*, 2022; PONOMAREV *et al.*, 2013). Estudos têm mostrado o envolvimento de miRNAs na patogênese de doenças neurodegenerativas. Alterações na expressão de miRNAs ou a presença de polimorfismos em sítios-alvo dessas moléculas no SNC de

pacientes com doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson, sugerem o papel dos miRNAs como importantes reguladores nesses distúrbios ou como importante fator de risco para o desenvolvimento dessas patologias (LI *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2015). Além disso, estudos têm mostrado o envolvimento de miRNAs na regulação da via de sinalização JAK2/STAT-3, e consequente modulação de resposta inflamatória induzida por microglia (WANG *et al.*, 2019; FAN *et al.*, 2022). O miRNA miR-155, por exemplo, têm sido associado a supressão de citocinas inflamatórias via redução de p-STAT-3 (PENA-PHILIPPIDES *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que algumas classes de flavonoides têm efeito antiinflamatório, neuroprotetor e são capazes de regular a expressão de miRNAs e, conseqüentemente, as propriedades pró-inflamatórias dessas moléculas nas células microgliais (MEDRANO-JIMÉNEZ *et al.*, 2022; SABOGAL-GUAQUETA *et al.*, 2015; KUMAR & PANDEY, 2013). Além disso, trabalhos tem mostrado o potencial destes compostos naturais em regular vias de sinalização como STAT-3, MAPK e Janus Kinase 2 (JAK2), modulando respostas inflamatórias em variados modelos de doenças do SNC (DO NASCIMENTO, *et al.*, 2022). Os flavonoides são um grupo de compostos polifenólicos de diferentes espécies vegetais e estudos têm apontado sua importância farmacológica devido aos variados efeitos biológicos apresentados, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antiviral (CHAVES *et al.*, 2022; DA SILVA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2012; PAULSEN *et al.*, 2011; SPOHR *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2008; HAVSTEEN, 2002). O biflavonoide agatisflavona presente na *Cenostigma pyramidalis* (Tul.) (sinônimo botânico de *Poincianella pyramidalis* e *Caesalpinia pyramidalis*), também tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (SOUZA *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2020a; DE ALMEIDA *et al.*, 2020b).

No entanto, o papel dos flavonoides na regulação de microRNAs e consequente regulação da ativação microglial em modelos de neurodegeneração ainda é pouco conhecido. Assim, neste trabalho, avaliamos o efeito do flavonoide agatisflavona na modulação da resposta neuroinflamatória de microglias humanas via regulação de miRNAs e mecanismos de sinalização em um modelo *in vitro* associado à doença de Alzheimer.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Culturas de células microgliais

Neste trabalho, utilizamos células microgliais obtidas do córtex de ratos Wistar recém-nascidos (0-2 dias de idade) e células microgliais humanas da linhagem C-20. Os animais para obtenção da microglia primária foram cedidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brasil). As linhagens microgliais C-20 foram cedidas pelo Dr. Henning Ulrich, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (protocolo CEUA nº 6731220818).

O isolamento da microglia de rato foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório Guaza do Instituto Cajal de Madrid (MECHA *et al.*, 2011). Os cérebros de ratos Wistar recém-nascidos foram removidos assepticamente e as meninges e vasos sanguíneos foram removidos de cada córtex. Em seguida, o material foi dissociado mecanicamente e filtrado em membrana Nitex (R&D®) estéril de 75 mm de diâmetro. O filtrado foi ressuspensão em meio DMEM (Island Biological Company-GIBICO®, in New York, United States), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10% de soro equino (SE), 4 mM de L-glutamina, antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco®). As células foram cultivadas em frascos revestidos com poli-D-lisina (25 µg/mL) (TPP, Zellkultur, Switzerland) em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Ao atingir a confluência, após 7 a 10 dias de cultura, as células microgliais aderentes foram colhidas por agitação a uma rotação de 165 rpm a 37 ° C por 3 h. A microglia isolada foi semeada em placas de 96, 48 ou 6 poços a uma densidade de 3 x 10⁴/cm². Os experimentos foram realizados 24 horas após o plaqueamento. Em todos os casos, as células foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂.

5.2.2. Drogas e tratamentos

As culturas celulares foram induzidas ao dano inflamatório com β -amilóide na concentração de 500nM por 4h, ou com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) na concentração de 1 μ g/mL (Sigma Aldrich, EUA) por 24 h. Em seguida, foram tratadas com o biflavonoide agatisflavona (FAB) extraído de *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis (sin: *Poincianella pyramidalis*, *Caesalpinia pyramidalis*), conforme descrito anteriormente (MENDES *et al.*, 2000), por cerca de 24h. O flavonóide foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) a uma concentração de estoque de 100 mM e armazenado a 4°C, protegido da luz. As células foram expostas ao flavonóide em uma concentração final de 1 μ M. A diluição final foi obtida no momento do tratamento, diluindo a solução estoque diretamente em meio de cultura fresco sem SFB. A concentração e o tempo de exposição adotados seguiram protocolos estabelecidos (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; DOS SANTOS *et al.*, 2023) e considerando nossos estudos anteriores sobre os efeitos da agatisflavona *in vitro* (DE ALMEIDA *et al.*, 2020b). As culturas controle foram tratadas com DMSO diluído em meio de cultura em volume equivalente à concentração de agatisflavona (0,01%). Após os tratamentos, foram realizadas análises experimentais com as células e com o meio de cultura condicionado (MCM) da condição controle e das demais condições de tratamento.

A preparação e solubilização do peptídeo β -amilóide (A β) a partir do peptídeo sintético A β 1-42 (American Peptide) foi realizada no Grupo de Neuroenergética e Neuroproteção da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) de acordo com o protocolo já estabelecido (DE FELICE *et al.*, 2008; LOURENCO *et al.*, 2013). As alíquotas de A β utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela UFRGS.

As preparações de oligômeros A β foram feitas a partir dessas alíquotas. Assim, alíquotas de A β foram ressuspensas em 2% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) para obter uma solução 5 mM. Essa solução foi diluída em PBS estéril a 100 μ M e incubada a 4 °C por 24 h. Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000 g por 10 min a 4 °C para remover os agregados A β insolúveis (fibrilas). O sobrenadante da centrifugação, contendo os oligômeros, foi mantido a 4°C até o uso. Para determinar a concentração de oligômeros nas preparações, foi utilizado o Kit BCA (BIO-RAD) pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

5.2.3. Análise de citotoxicidade celular

O ensaio com 3-(4,5- brometo de dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi usado para avaliar a citotoxicidade na microglia. Para isso, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (Kasvi) por 24 h. Em seguida, as células foram incubadas com o β -amilóide (500nM) ou na condição controle (DMSO) por cerca de 4 h e depois tratadas por 24 h com agatisflavona (1 μ M). Após este período, foram incubadas com o MTT (Cas 298931; Sigma-Aldrich) na concentração final de 1 mg/mL por 2 h. Em seguida, foi adicionado a solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) e dimetilformamida (DMF) a 50% (v/v), em pH 4,7 para promover a lise celular. Então, as placas foram mantidas a 37 °C durante a noite para dissolver os cristais de formazan. A viabilidade celular foi quantificada pela conversão do MTT amarelo em cristais de formazan roxo, promovido por desidrogenases mitocondriais de células vivas (HANSEN *et al.*, 1989). Para isso, a densidade óptica de cada amostra foi medida em comprimento de onda de 540 nm usando o leitor de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Plate). Três experimentos independentes foram realizados para cada análise. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade dos grupos tratados em relação ao controle, que foi considerado 100%.

5.2.4. RT- qPCR para miRNA

A avaliação da regulação de expressão de miRNAs foi realizada através do RT-qPCR. O miRNA (contendo miRNAs solúveis) foi purificado a partir de células C-20 tratadas por 24 h com agatisflavona (1 μ M) e/ou β -amilóide (500nM) e/ou LPS (1 μ g/mL) ou na condição controle (DMSO) conforme já descrito (SILBER *et al.*, 2008) utilizando o kit miRNeasy (Qiagen) para o pellet da cultura celular. Em seguida, foi realizada uma quantificação por espectrometria através do Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para a síntese do cDNA foram utilizados 10 ng de amostra e o protocolo foi seguido conforme as recomendações do fabricante. Os miRNAs investigados foram: miR146a (hsa-

miR-146a-5p) e miR155 (hsa-miR-155), que já demonstraram efeito relevante na modulação do perfil inflamatório de microglia. A amplificação foi realizada no termociclador ABI7500 FAST (Applied Biosystem) e foi utilizado o mastermix SyBR™ Green PCR (Thermo Fisher Scientific). O controle endógeno RNU1A1 foi utilizado para normalizar os resultados. A expressão dos níveis de mRNA foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008) e analisada usando Graphpad Prism v9 (Califórnia, EUA, 2020). Os resultados representam três experimentos independentes.

5.2.5. RT-qPCR para citocinas

Para avaliar a expressão gênica de citocinas de interesse, após o período de tratamento das culturas, o meio de cultura foi removido e o RNA total foi extraído com o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, 15596026). A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. A pureza e concentração de RNA total foram determinadas por análise espectrofotométrica usando KASVI Nano Spectrum (cat# K23-0002). Os contaminantes de DNA foram removidos tratando as amostras de RNA com DNase usando o kit Ambion DNA-free (cat# AM1906, Life Technologies™). Para a síntese de cDNA, o kit SuperScript® VILO™ MasterMix (cat# MAN0004286, Invitrogen™, Life Technologies) foi usado em uma reação de 20 µL com uma concentração de 2,5 µg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada usando Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, EUA) contendo dois primers para amplificar a sequência de interesse, uma sonda específica Taqman® MGB e TaqMan Universal Master Mix II com UNG (cat # 4440038 Invitrogen, Life Technologies™). Os ensaios correspondentes aos genes quantificados neste estudo foram IL1β (Rn00580432_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-10 (Rn00563409_m1) e NOS2 (Rn00580555_m1). A PCR em tempo real foi realizada usando o sistema Quant Studio 7 Flex™ Real Time PCR (Applied Biosystems, CA, EUA). As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. Os alvos actina beta (ACTB) (Rn00667869_m1) e hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1)

(Rn01527840_m1) foram usados como genes de referência (controles endógenos) para normalização dos dados de expressão gênica. Os dados foram analisados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

5.2.6. Western blot para proteínas da via de sinalização STAT3

Para avaliar a expressão das proteínas da via de sinalização STAT3 por *western blot*, as células microgliais obtidas do córtex de ratos Wistar recém-nascidos foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/poço. As culturas foram induzidas ao dano inflamatório com β -amilóide na concentração de 500 nM por 4 h e em seguida, foram tratadas com o biflavonoide agatisflavona (FAB) por 24 h. Após este período, as proteínas totais foram extraídas com tampão de extração SDS a 2% (w/v), 2 mM de etileno glicol-bis[β -aminoetil éter]-N, N, N'N'-ácido tetraacético (EGTA), 4 M de uréia, 0,5% (v/v) de Triton X-100, 62,5 mM de tampão Tris-HCl (pH 6,8), suplementado com 1 μ l/ml de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, St Louis, MO). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (1951), usando um kit reagente para dosagem de proteína (Bio-Rad, Hercules, CA). As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Vinte e cinco microgramas (25 μ g) de proteínas totais foram submetidas a corrida eletroforética em gel de empilhamento a 4%, e no gel de corrida a 8% (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em 200 V por 45 min. Após corrida, as proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.), a 100 V por cerca de 1 h. A presença de proteínas na membrana foi confirmada pela coloração da membrana com Ponceau Red (Sigma). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente em 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite desnatado. Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight, à temperatura ambiente com os anticorpos primários anti-STAT3 produzido em rato e anti-pSTAT3 produzido em cabra, na diluição 1:1000, sob lenta agitação, ambos diluídos em TBS-T com 1% de leite desnatado. As membranas foram lavadas três vezes em TBS-T por 10

minutos cada, seguidas de uma lavagem com TBS, visando retirar o excesso de Tween 20 das membranas. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o kit de luminescência (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A determinação quantitativa das bandas reativas foi realizada através de análise densitométrica da imagem digitalizada, obtida através do sistema de aquisição de imagem (ScanJet 4C – HP), e utilizando-se o software ImageJ 1.4.6 u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

5.2.7. Avaliação da concentração de Ca^{2+} por microfluorimetria

As alterações na concentração de Ca^{2+} iônico $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram determinadas por microfluorimetria usando o aparelho FlexStation III (Molecular Devices Corp.), seguindo as instruções do fabricante (SYKES, DOWLING & CHARLTON 2009). Para isto, as células microgliais da linhagem C20 foram semeadas no dia anterior em microplaca preta de 96 poços com fundo transparente. As células foram semeadas a uma densidade de 12×10^3 células/poço. Após 24 h da semeadura, as células foram incubadas com reagente A de um kit de ensaio de cálcio FLIPR Flex Station (dispositivos moleculares Corp.) conforme descrito nas instruções do fabricante (GLASER *et al.*, 2014). O agonista ATP foi aplicado às células, e os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram determinados como o pico intensidade de fluorescência menos a intensidade de fluorescência basal usando o software SoftMax2Pro (Molecular Devices Corp). Os dados foram expressos como os valores médios \pm SEM.

5.2.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism v9 (Califórnia, EUA, 2020) e registrados como mediana \pm erro padrão das médias (SEM) dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos, foi realizada análise de variância por meio do teste OneWay ANOVA, seguido do pós-teste de Student-Newmann-Keuls para os dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, foi realizada análise por meio do pós-teste de Kruskal-Wallis e Dunn. Os intervalos de confiança foram definidos a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente

significativo. Em todas as figuras, as barras de erro representam SEM de pelo menos três experimentos independentes.

5.3. Resultados

5.3.1. Agatisflavona modula o perfil de ativação microglial induzida por β -amilóide e LPS

A literatura têm mostrado que tanto os lipopolissacarídeos (LPS) quanto os oligômeros β -amilóide ($A\beta$) são capazes de induzir a ativação microglial a respostas inflamatórias (SANTOS *et al.*, 2023; DOURADO *et al.*, 2020). Neste trabalho, investigamos os efeitos do flavonoide agatisflavona (FAB) na modulação dessa ativação em células microgliais humanas da linhagem C20. Para isso, avaliamos o efeito de FAB na morfologia e viabilidade celular, usando microscopia de contraste de fase e o teste MTT, respectivamente (**Figura 1**). Nas culturas do controle (DMSO) e naquelas tratadas apenas com o flavonoide (FAB), a microglia apresentou uma morfologia predominantemente multipolar e ramificada, com prolongamentos finos e longos que se estendiam desde os corpos celulares (Fig. 1A-a,b e 1B-a,b). Por outro lado, em culturas tratadas com LPS ou oligômeros de β -amilóide, a microglia exibiu uma morfologia amebóide, com corpos celulares maiores e retração dos prolongamentos citoplasmáticos, que eram curtos e espessos. Além disso, observamos muitas células arredondadas e restos celulares típicos do processo de morte por apoptose (Fig. 1A,c e 1B,c). Essas alterações morfológicas foram reduzidas em culturas induzidas ao dano e posteriormente tratadas com agatisflavona, com presença de microglias mais ramificadas (Fig. 1A,d e 1B,d). No ensaio MTT, observamos uma diminuição significativa na viabilidade das células microgliais após estimulação ao dano com LPS. Nas culturas estimuladas ao dano com $A\beta$, houve redução na viabilidade, embora sem significância estatística. Por outro lado, nas culturas estimuladas ao dano com LPS ou $A\beta$ e posteriormente tratadas com o flavonoide, embora não tenha sido observado aumento significativo na viabilidade celular (Fig. 1C), foi observado na microscopia de contraste de fase prevalência de células mais ramificadas e menos reativas (Fig. 1A e 1B).

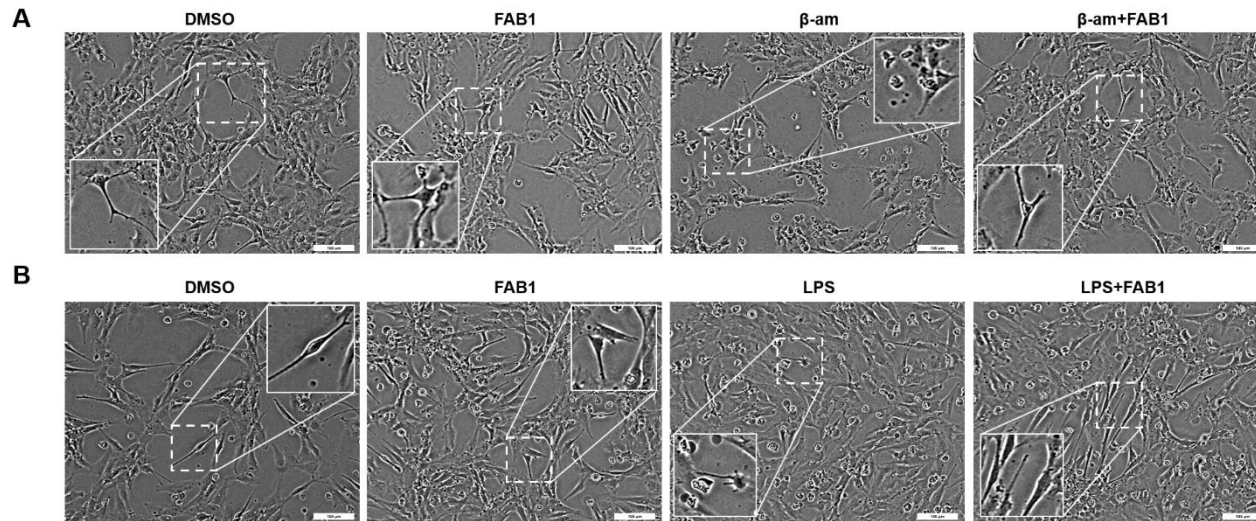
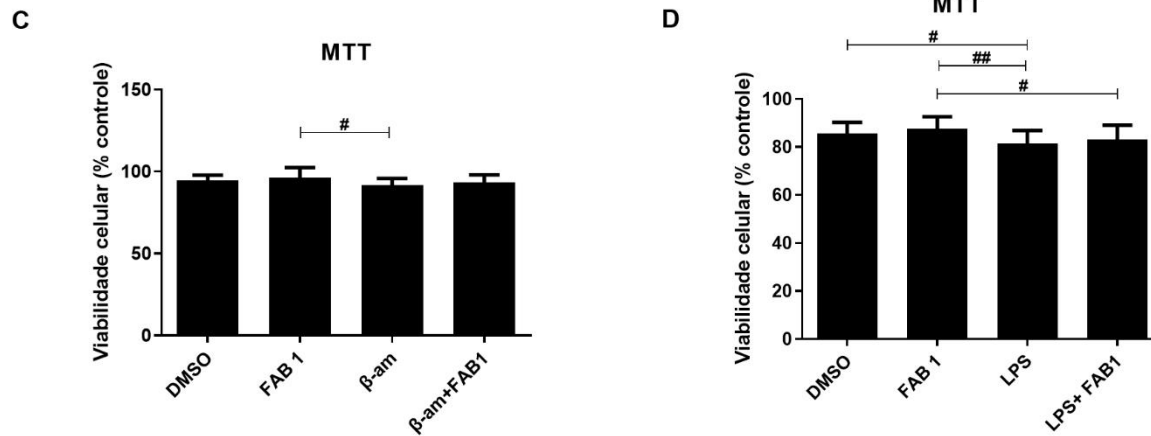


Figura 1. Efeitos da agatisflavona na microglia humana tratada com β -amilóide ou LPS. Culturas de microglia humana da linhagem C20 foram expostas a β -amilóide (500nM) por 4h ou a LPS (1 μ g/mL) por 24h e/ou tratadas com 1 μ M de agatisflavona (FAB1) por 24h. (A) Fotomicrografias de contraste de fase de células microgliais nos diferentes grupos de tratamento; barra de escala = 100 μ m. (B) análise MTT da viabilidade das células microgliais nos diferentes grupos de tratamento; resultados expressos em relação aos controles (100%) e testados quanto à significância por one-way ANOVA; #, ## ou ### $p < 0,05$. β -am: β -amilóide; FAB1: agatisflavona; LPS: lipopolissacarídeo.



5.3.2. Agatisflavona regula a expressão de miRNA e reduz a ativação microglial

Em nosso trabalho, avaliamos em culturas de células microgлияis humanas da linhagem C20, o efeito do flavonoide agatisflavona na regulação da expressão dos microRNAs miR146a e miR155, após estimulação induzida por oligômeros do peptídeo β -amilóide e por LPS (**Figura 2**). Observamos que as culturas C20 submetidas ao estímulo danoso com oligômeros β -amilóides ou com LPS, apresentaram um aumento significativo na expressão de miR-146a e miR-155. Por outro lado, células estimuladas com o dano e tratadas com flavonoides apresentaram redução significativa na expressão desses miRNAs. A agatisflavona sozinha também aumentou a expressão de miR-146a para níveis basais próximos ao do controle DMSO.

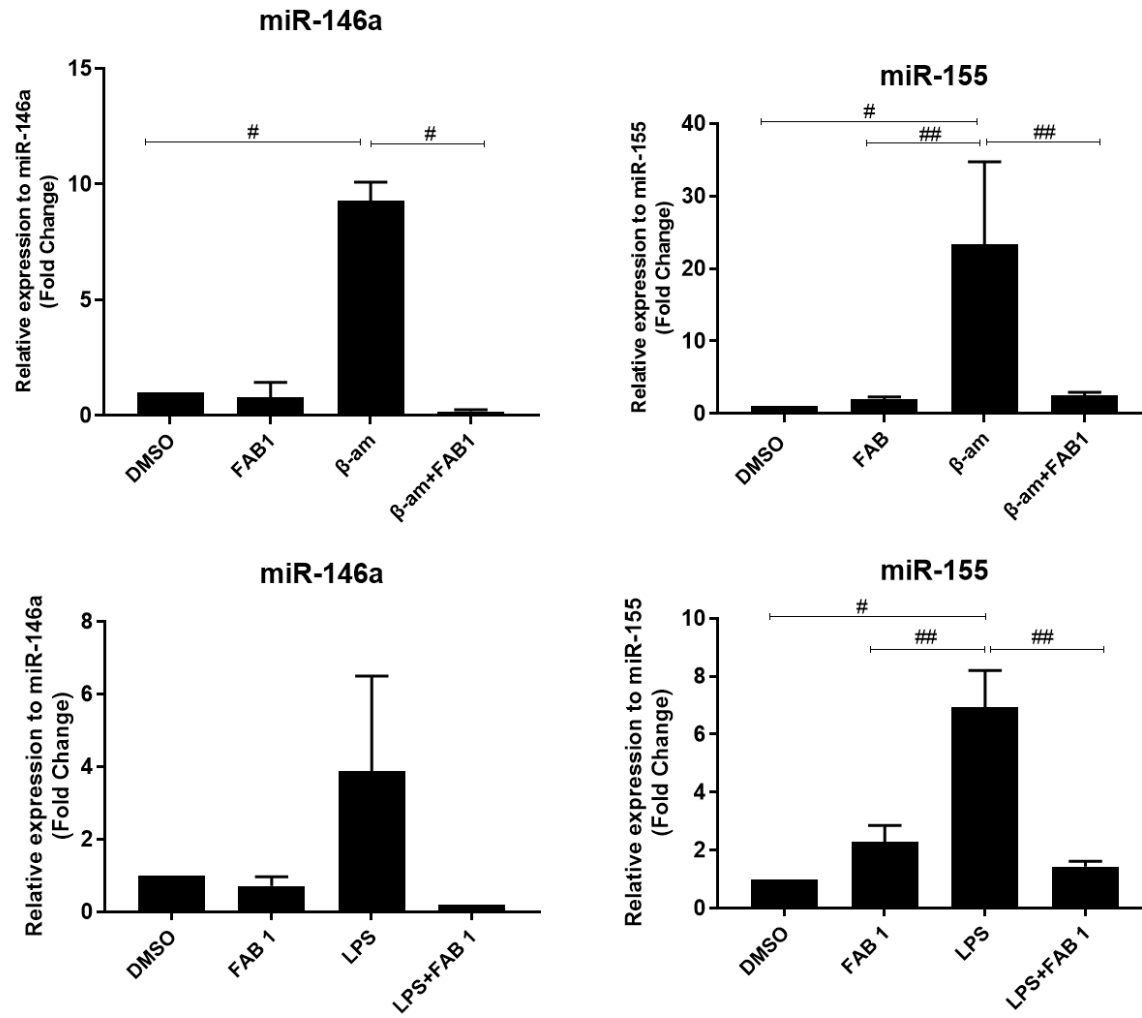


Figura 2. Efeitos da agatisflavona em microRNAs (miRNAs) da microglia humana tratada com β -amilóide ou LPS. Culturas de microglia humana da linhagem C20 foram expostas a β -amilóide (500nM) por 4h ou a LPS (1 μ g/mL) por 24h e/ou tratadas com 1 μ M de agatisflavona (FAB1) por 24h. RT-qPCR para miRNA foi realizado para determinar os níveis de expressão relativa de miRNA-146a e miRNA-155. Dados apresentados como variação média \pm SEM dos controles. Eles foram testados quanto à significância por one-way ANOVA; # ou ## $p < 0,05$ ($n = 3$). β -am: β -amilóide; FAB1: agatisflavona; LPS: lipopolissacarídeo.

5.3.3. Agatisflavona regula a expressão de citocinas inflamatórias em culturas de microglia humana submetidas ao dano com β -amilóide

Em nosso trabalho, também avaliamos a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e NOS2, e da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Figura 3**). Observamos que nas culturas estimuladas ao dano com oligômeros de β -amilóide, houve um aumento significativo na expressão desses mediadores inflamatórios, em relação ao controle. Por outro lado, em culturas estimuladas ao dano e posteriormente tratadas com agatisflavona, observamos uma redução significativa na expressão dessas citocinas, quando comparadas aos grupos que receberam apenas o estímulo inflamatório. Em relação à expressão de IL-10, também observamos um aumento significativo na expressão dessa citocina nas culturas induzidas ao dano, quando comparada ao grupo controle. No grupo estimulado ao dano e tratado com o flavonoide, também observamos uma expressão elevada em relação ao grupo controle, porém menor quando comparada ao grupo estimulado com β -amilóide.

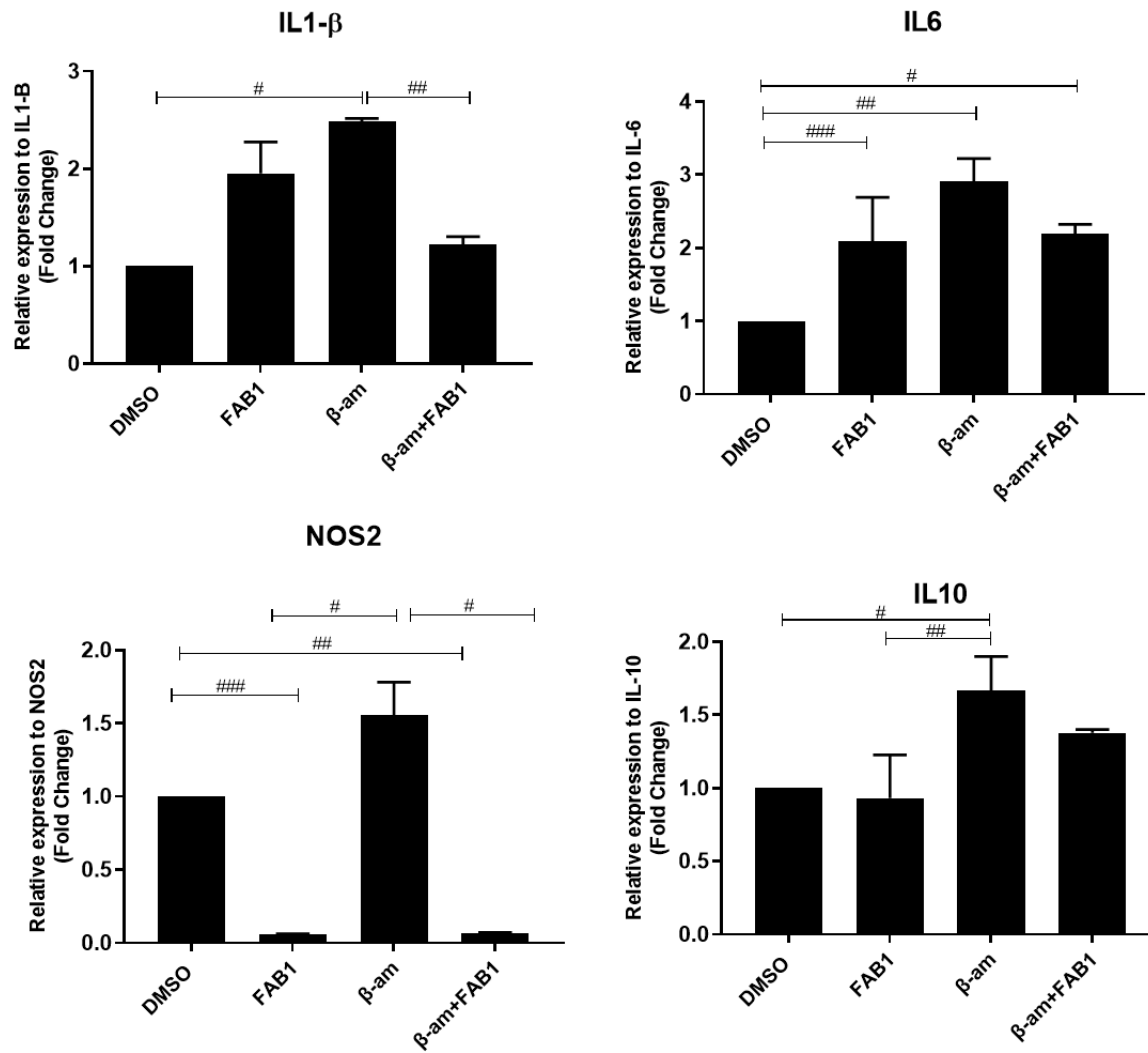


Figura 3. Efeitos da agatisflavona em genes inflamatórios em microglia tratada com β -amilóide. Culturas de microglia humana da linhagem C20 foram expostas a β -amilóide (500 nM) por 4 horas e/ou tratadas com 1 μ M de agatisflavona (FAB1) por 24 horas e RT-qPCR foi realizado em células microgliais para determinar os níveis de expressão relativa de mRNA para os mediadores inflamatórios IL1 β , IL6, NOS2 e citocina anti-inflamatória IL-10. Dados apresentados como variação média \pm SEM em relação aos controles. Foram testados quanto à significância por one-way ANOVA; #, ## ou ### $p < 0,05$ ($n = 3$). β -am: β -amilóide; FAB1: agatisflavona.

5.3.4. A expressão de STAT-3/pSTAT-3 é modulada por agatisflavona em células da microglia

Neste trabalho, também buscamos avaliar se o flavonoide agatisflavona modula a expressão das proteínas de sinalização STAT3 e P-STAT3, considerando a participação dessas proteínas sinalizadoras na regulação de processos inflamatórios e na expressão de citocinas. Para isso, células microgliais derivadas de cultura primária de rato foram estimuladas ao dano inflamatório com oligômeros de β -amilóide por um período de 4 h. Observamos que nas células estimuladas apenas com β -amilóide, houve um aumento na relação p-STAT3/STAT3, em comparação com as células tratadas apenas com o controle. Por outro lado, nas células estimuladas com β -amilóide e tratadas com flavonoide a 1 μ M, houve redução na relação p-STAT3/STAT3, em comparação com células estimuladas apenas com o dano inflamatório (**Figura 4**).

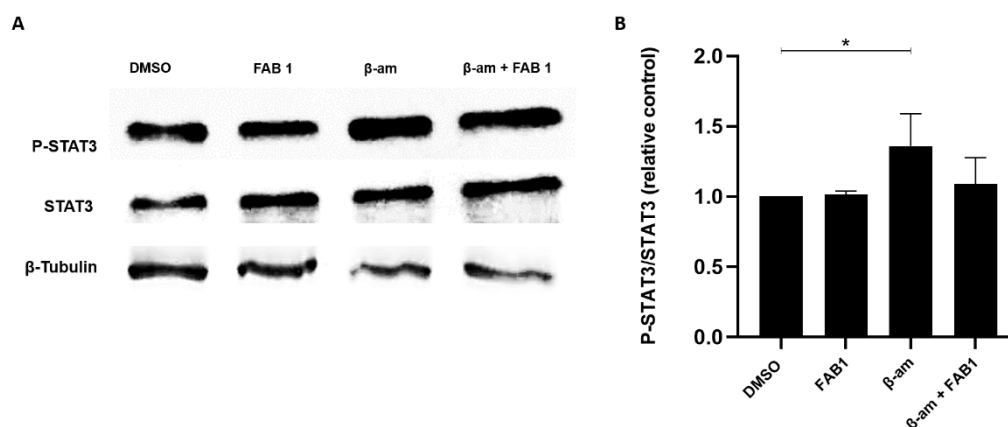


Figura 4. Efeitos da agatisflavona na via de sinalização P-STAT3 na microglia de rato tratada com β -amilóide. Culturas de células da microglia foram expostas a β -amilóide (500 nM) por 4h e/ou tratadas com 1 μ M de agatisflavona (FAB1) por 24h. Amostras de 25 μ g de proteínas totais foram corridas eletroforéticamente e a análise de Western blot para P-STAT3/STAT3 foi realizada em um gel de 10% de poliacrilamida. (A) Western blots representativos mostrando que o tratamento com FAB regulou negativamente a expressão de P-STAT3 em células microgliais. (B) Análise semiquantitativa da expressão relativa P-STAT3/STAT3 apresentado como razão relativa ao controle. Dados apresentados como variação média \pm SEM dos controles, testados quanto à significância por one-way ANOVA; # $p < 0,05$ ($n = 3$). β -am: β -amilóide; FAB1: agatisflavona.

5.3.5. Agatisflavona regula a concentração de Ca^{2+} citosólico, via receptor purinérgico

Observamos que a linhagem microglial C20 expressa o receptor P2Y2 (Figura 5A). Observamos também que ao tratar a cultura de células C20 com concentrações crescentes do agonista de receptores purinérgicos ATP (ATP: 0,1 μM a 3 μM) associado a concentração fixa de 10 μM do flavonoide agathisflavona (Figura 5B), observamos que a concentração de Ca^{2+} citosólico se manteve tendendo a uma constante. Por outro lado, houve aumento de Ca^{2+} a partir de 10 μM do agonista ATP (Figura 5B). De outra forma, o grupo tratado com a associação de concentração fixa do agonista ATP (10 μM) e concentração variada do flavonoide (0,15 μM a 10 μM), observamos que as concentrações do Ca^{2+} se mantiveram elevadas, exceto quando tratado com 10 μM do flavonoide, no qual apresentou concentrações do Ca^{2+} semelhantes (Figura 5C).

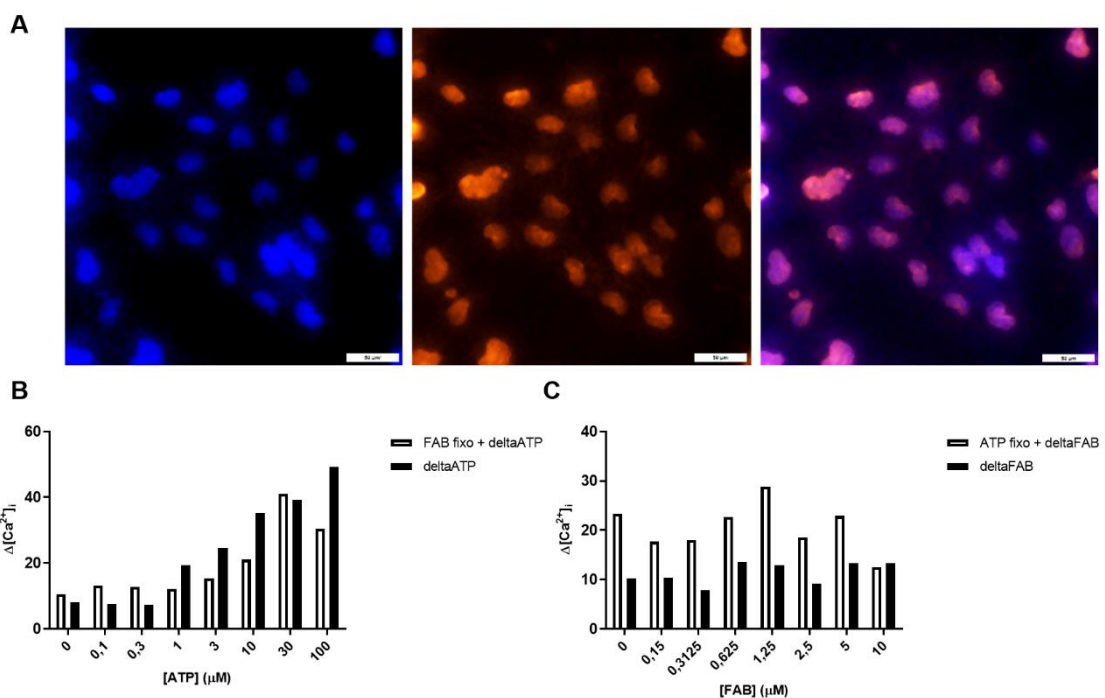


Figura 5. Efeitos da agatisflavona na via e mobilização de inos Ca^{2+} . (A) Análise da expressão de P2Y2 em culturas microgliciais humanas. Núcleos celulares foram corados com DAPI (azul); ampliação de 20x. Barra de escala = 50 μm . (B) avaliação da concentração de Ca^{2+} iônico citosólico, variando a concentração do ATP e mantendo concentração fixa de agathisflavona em 1 μM . (C) avaliação da concentração de Ca^{2+} iônico citosólico, mantendo concentração fixa do ATP e variando a concentração de agathisflavona (variação de 0,15 μM a 10 μM).

5.4. Discussão

A microglia desempenha um papel importante na defesa imunológica do sistema nervoso central (SNC). Em seu estado de repouso, a microglia possui uma morfologia bem ramificada e interage com neurônios, outras células gliais e o microambiente circundante, realizando vigilância imunológica e contribuindo para a manutenção da homeostase do SNC (GUO *et al.*, 2019). Quando em seu estado ativado, como ocorre em processos que danificam o SNC, como as doenças neurodegenerativas (DND), a microglia se transforma, alterando sua morfologia, passando a proliferar, migrar e liberar mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina 6 (IL-6) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são prejudiciais ao SNC (DA SILVA *et al.*, 2017). No presente trabalho, usamos um modelo de neuroinflamação induzida por oligômeros de β -amilóide ou pelo LPS em culturas de microglia humana da linhagem C20 e avaliamos o potencial do biflavonoide agatisflavona para modular a resposta inflamatória microglial via regulação de micro-RNAs e mediadores inflamatórios.

Como mostrado em nossos resultados, tanto os estímulos com β -amilóide quanto com LPS induziram ativação microglial, caracterizada por alterações morfológicas e no perfil regulado de citocinas (**Figuras 1 e 3**), com células exibindo encurtamento das projeções citoplasmáticas e aumento da expressão de mediadores inflamatórios, propriedades que são características de um estado inflamatório ativo. Porém, nas culturas induzidas ao dano, houve redução da viabilidade celular, demonstrada no ensaio de MTT, o que pode explicar a presença de células arredondadas e detritos celulares característicos de apoptose, observados nos grupos tratados com β -amilóide ou com LPS. Por outro lado, observamos que o flavonoide inibiu significativamente esse perfil de alterações reativas na microglia, induzidas por β -amilóide ou por LPS, com predominância de células mais ramificadas e redução na expressão de mediadores inflamatórios, mostrando o potencial de agatisflavona para modular a ativação microglial. Em trabalho realizado por SANTOS, *et al.*, (2023), foi mostrado também em modelo de neuroinflamação usando cultura primária de microglia de rato, que o flavonoide agatisflavona reduziu a expressão de

mediadores inflamatórios e regulou negativamente a expressão do complexo inflamossoma NLRP3, em culturas induzidas ao dano com LPS. Os autores observaram também que nas culturas induzidas ao dano e tratadas com agatisflavona, houve uma prevalência de microglias menos reativas, apresentando morfologia mais ramificada. Resultado semelhante foi observado por DOURADO, *et al.*, 2020, em modelo de neuroinflamação com cultura primária de microglia de rato, na qual os autores mostraram o efeito neuroprotetor e neuroimunomodulador do flavonoide apigenina, nas culturas de microglia estimuladas ao dano inflamatório com LPS ou com oligômeros do peptídeo β -amilóide.

No sistema nervoso central (SNC), as microglias normalmente se comportam em estado quiescente, e quando ativadas sofrem alterações morfológicas, proliferam, migram por quimiotaxia e são induzidas a produzir citocinas e quimiocinas envolvidas em respostas inflamatórias e imunomoduladoras. No entanto, os estímulos e mecanismos envolvidos neste processo de ativação microglial ainda não são bem compreendidos. Atualmente, há um número crescente de estudos sobre o envolvimento de miRNAs e sua relação com a resposta microglial. Alterações na regulação de moléculas de miRNA em células da micróglia ativadas, por exemplo, têm contribuído para o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e lesões cerebrais.

Os microRNAs (miRNA) são pequenas moléculas de RNA endógeno não codificantes que possuem cerca de 20 a 22 nucleotídeos. Essas moléculas surgem como novos alvos nas investigações dos mecanismos regulatórios de inúmeros processos celulares, pois atuam como reguladores que reprimem a expressão de genes-alvo (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2019). Estudos mostraram que muitos desses miRNAs estão associados à regulação do crescimento, desenvolvimento e regulação de processos celulares, como diferenciação, metástase e proliferação (ZHANG *et al.*, 2018; WU & WANG, 2020). Além disso, tem sido mostrado também que o fenótipo microglial pró-inflamatório (M1) é caracterizado pela liberação de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, NO, PGE2 e pela regulação positiva de miR-155, miR-146 (MEDRANO-JIMÉNEZ *et al.*, 2022). Em nosso trabalho, observamos que a agatisflavona aumentou a expressão de miR-146a em células C20.

Também observamos que a estimulação de células C20 com oligômeros de β -amilóide ou com LPS aumentou a expressão de miR-146a. Por outro lado, células estimuladas com dano e tratadas com flavonoide apresentaram redução significativa na expressão do miRNA-146a. O aumento da expressão do miRNA-146a, em situações de estímulo inflamatório, infere na exigência dessa molécula para regular negativamente a expressão de mediadores da inflamação (SABA *et al.*, 2012). Conforme observado em nosso trabalho, após dano promovido com β -amilóide ou com LPS, houve aumento significativo do miRNA-146a e também das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e NOS2, sugerindo ativação microglial para um perfil inflamatório, apesar da elevação do miRNA146a. Por outro lado, o tratamento apenas com flavonoide levou a um ligeiro aumento na expressão do miRNA-146a. E nas células previamente estimuladas ao dano e tratadas com o flavonoide, observamos que a expressão do miRNA reduziu em relação ao dano, voltando a valores basais próximos ao do controle DMSO, em que as células permanecem em estado não ativado. Houve também redução significativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias.

A expressão do miR-146a ocorre de maneira dependente de NF- κ B (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022; SABA *et al.*, 2012; KARTHIKEYAN *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2016), e estudos indicam que o miR-146a modula a resposta imune inata e a neuroinflamação, regulando negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e seus mediadores em células microgliais e astrocíticas. Em macrófagos THP-1 humanos estimulados com LPS, foi demonstrada uma regulação positiva dos miRNAs 146a, 155 e 132, sendo os genes IRAK1 e TRAF6 os alvos da repressão pós-traducional promovida pelo miR-146. Também foi demonstrado que os receptores TLR2 e TLR4 estão envolvidos na expressão positiva de miR-146a, quando ativados por seus agonistas (SABA *et al.*, 2012; TAGANOV *et al.*, 2006). Em trabalho com modelo de disfunção cognitiva pós-operatória (DCPO) em camundongos, foi demonstrado aumento da expressão de miR-146a, com conseqüente redução de citocinas inflamatórias na região do hipocampo. Nesse mesmo estudo, os autores também observaram aumento da expressão de miR146a em células microgliais BV-2 estimuladas com LPS, sugerindo a participação desse miRNA na regulação negativa da ativação microglial (CHEN *et al.*, 2019). Citocinas como IL-1 β também demonstraram

induzir a expressão de miR-146a, levando à regulação negativa da resposta neuroinflamatória mediada por astrócitos humanos (JUNN *et al.*, 2012).

Em relação ao miR-155, observamos em nosso estudo que nos grupos induzidos a dano inflamatório com β -amilóide ou LPS, houve um aumento na expressão do miRNA-155. Por outro lado, quando as culturas foram tratadas com o flavonóide após o período de dano inflamatório, observamos uma redução significativa na expressão do miR-155 (**Figura 2**). Estudos tem mostrado que o aumento da expressão de miR-155 está associado à ativação e a proliferação microglial. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo regulatório desse micro-RNA e sua participação na neuroinflamação. Em modelos de doença de Alzheimer (DA) induzida com β -amilóide em camundongos, foi demonstrado aumento da expressão de miR-155 e microglia ativada, com aumento da secreção de citocinas inflamatórias (GUEDES *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2019). YIN *et al.*, (2017) mostraram em células microgliais BV2, que o tratamento com LPS regulou positivamente a expressão de miR-155, com consequente aumento de citocinas inflamatórias, sendo a RACK-1 (receptor para proteína C quinase ativada-1) o alvo de ação do miR-155. Por outro lado, CHUMSAKUL *et al.*, (2020) mostraram em células microgliais de camundongos estimulados com LPS, que o flavonóide apigenina inibiu a ativação da microglia no perfil M1, bem como suprimiu a expressão de miR-155 de maneira dose-dependente.

Neste trabalho, mostramos também que a agatisflavona reduziu a expressão de STAT-3 fosforilado em cultura de microglias submetidas a danos inflamatórios. Já é conhecido que a via de sinalização JAK/STAT medeia uma variedade de processos biológicos, e sua ativação tem sido intimamente relacionada a doenças inflamatórias e autoimunes. Nesse caso, um gatilho importante na ativação de JAK/STAT é a ligação das citocinas aos seus receptores de membrana correspondentes. E a resposta resultante dessa ativação dependerá do ligante e de seu receptor, que desencadeará eventos de transdução de sinal intracelular e expressão gênica alterada, como é o caso da exacerbação da fibrose hepática por ativação de JAK1/STAT3 via TGF- β (LIU *et al.*, 2023). Outros estudos mostraram que a inibição da sinalização JAK2/STAT3 diminui a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, e o envolvimento de miRNAs na regulação da via JAK2/STAT-3, como miRNA-29b e miRNA-155 (WANG *et al.*, 2019; MURRAY, 2007; PENA-PHILIPPIDES *et al.*,

2016; FAN *et al.*, 2022). Foi mostrado também, em estudo com modelo *in vivo* de lesão isquêmica, que a inibição do miR-155 suprimiu a sinalização de citocinas pela redução de p-STAT-3, após 7 dias da lesão isquêmica no córtex cerebral de camundongos C57BL/6, revertendo essa supressão após 14 dias de lesão (PENA-PHILIPPIDES *et al.*, 2016). Em outros estudos recentes, foi mostrado que a estimulação por LPS ou o dano provocado em modelos de isquemia/reperfusão em camundongos STAT3^{fl/fl} e STAT3^{fl/fl} LysM^{cre+}, podiam induzir a polarização fenotípica da microglia, pela ativação da via JAK2/STAT3 (PENG-FEI *et al.*, 2021; ZHONG *et al.*, 2022). Assim, baseado nos resultados apresentados neste trabalho, podemos sugerir que a exposição ao β -amilóide pode regular a polarização fenotípica da microglia ao perfil inflamatório através da ativação da via de sinalização JAK2/STAT3, e que o flavonoide agatisflavona pode atuar interferindo nesta ativação.

Como sabemos, células microgliais expressam variados tipos de receptores purinérgicos, com destaque para o P2Y2R (INOUE, 2008). Estes receptores, sejam ionotrópicos ou metabotrópicos, além de desempenharem inúmeras funções fisiológicas em microglia, estão também associados a ativação microglial e a uma variedade ampla de doenças que comprometem o SNC, dentre elas as neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (INOUE, 2008; WEISMAN *et al.*, 2012). Estudos realizados em fatias de cérebro de roedores têm mostrado altos níveis de expressão de P2Y2R em células presentes no hipocampo e cerebelo (WEISMAN *et al.*, 2005). Na microglia, a ativação de receptores metabotrópicos P2Y por seus agonistas, como o ATP, leva à estimulação da fosfolipase C, que inicia a produção de inositol-(1,4,5)-trifosfato (InsP3) e diacilglicerol (DAG), e consequente aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e estimulação da proteína quinase C, que contribui com a regulação da secreção de quimiocinas e de outros mediadores pró-inflamatórios (ANTONIOLI *et al.*, 2019). Neste sentido, avaliamos também neste trabalho, o papel de agatisflavona na concentração de Ca²⁺ citosólico em células de microglia da linhagem C20, e observamos a capacidade do flavonoide em regular a concentração de Ca²⁺ via receptor purinérgico.

As moléculas de ATP e outros nucleotídeos desempenham função de sinalização ao perigo ou presença de lesões celulares e teciduais, promovendo a ativação de microglia em condições fisiopatológicas. Como sabemos, estas

moléculas são agonistas destes receptores purinérgicos, e uma vez presentes no microambiente, promovem a sua ativação, contribuindo com uma resposta microglial rápida aos estímulos danosos. Dentre estas repostas, podemos citar a motilidade microglial em direção ao sítio da lesão, o crescimento de processos e a liberação de mediadores pro-inflamatórios (VERKHRATSKY & BUTT, 2013). A ativação do P2Y2R pelo agonista ATP ou UTP tem sido associada a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} , e ativação da proteína quinase C (PKC). Além disso, trabalhos tem apontado que a ativação de P2Y2R também estimula a fosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e consequentemente contribui com a regulação do crescimento celular, motilidade, diferenciação e alterações morfológicas associadas ao citoesqueleto. Por exemplo, trabalhos tem mostrado que a ativação de P2Y2R leva ao processo de diapedese em monócitos, com ruptura das junções aderentes intercelulares e rearranjos do citoesqueleto celular (BAGCHI *et al.*, 2005).

Em processos neuroinflamatórios, nos quais ocorrem ativação de células gliais, como a microgliose, a migração de células microgliais em direção às áreas lesionadas estão associadas também a ativação de P2Y2R (KIM *et al.*, 2012; WEISMAN *et al.*, 2012). Em nossos resultados, observamos que as culturas tratadas com o flavonoide agatisflavona tenderam a apresentar concentrações citosólicas baixas do Ca^{+2} , sugerindo desta forma um possível efeito de antagonismo a receptor purinérgico P2Y. Entretanto, se faz necessário mais investigações com agonistas específicos do receptor P2Y2, considerando que o agonista ATP usado em nosso estudo, pode ativar outros grupos de receptores P2Y. Importante destacar também que recentemente, estudos têm mostrado evidências da interação entre a sinalização purinérgica e os microRNAs, onde alguns miRNAs tem sido associados a modulação de respostas purinérgicas em modelos de doenças do SNC (GUO *et al.*, 2023).

5.5. Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem a importância de miR-146a e miR-155 como alvos promissores no controle da ativação microglial e neuroinflamação. Eles também reforçam a importância das proteínas sinalizadoras STAT3 na indução de processos inflamatórios, como a neuroinflamação, e mostram a capacidade do flavonoide agatisflavona em

reduzir a neuroinflamação por meio da regulação negativa desses microRNAs, e mecanismos de sinalização intracelular via STAT3. Além disso, os resultados mostram a capacidade do flavonoide em regular negativamente a concentração microglial de cálcio citosólica, sugerindo seu efeito no antagonismo de receptores purinérgicos. Assim, o conjunto dos resultados aqui apresentados reforçam o potencial do flavonoide agatisflavona como molécula promissora a agente terapêutico para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

5.6. Referências

1. ABUBAKAR MB, SANUSI KO, UGUSMAN A, MOHAMED W, KAMAL H, IBRAHIM NH, KHOO CS, KUMAR J. Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Front Aging Neurosci.* 2022 Mar 30;14:742408. doi: 10.3389/fnagi.2022.742408.
2. BAGCHI S, LIAO Z, GONZALEZ FA, CHORNA NE, SEYE CI, WEISMAN GA, ERB L. The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alphav integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39050-7. doi: 10.1074/jbc.M504819200.
3. BISPO DA SILVA A, CERQUEIRA COELHO PL, ALVES OLIVEIRA AMPARO J, ALVES DE ALMEIDA CARNEIRO MM, PEREIRA BORGES JM, DOS SANTOS SOUZA C, DIAS COSTA MF, MECHA M, GUAZA RODRIGUEZ C, AMARAL DA SILVA VD, LIMA COSTA S. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chem Biol Interact.* 2017 Aug 25;274:89-99. doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.004.
4. CHAVES OA, LIMA CR, FINTELMAN-RODRIGUES N, SACRAMENTO CQ, DE FREITAS CS, VAZQUEZ L, TEMEROZO JR, ROCHA MEN, DIAS SSG, CARELS N, BOZZA PT, CASTRO-FARIA-NETO HC, Souza TML. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. *Int J Biol Macromol.* 2022 Dec 1;222(Pt A):1015-1026. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204.
5. CHEN L, DONG R, LU Y, ZHOU Y, LI K, ZHANG Z, PENG M. MicroRNA-146a protects against cognitive decline induced by surgical trauma by suppressing hippocampal neuroinflammation in mice. *Brain Behav Immun.* 2019 May; 78:188-201. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.020.
6. CHUMSAKUL O, WAKAYAMA K, TSUHAKO A, BABA Y, TAKAI Y, KUROSE T, HONMA Y, WATANABE S. Apigenin Regulates Activation of Microglia and Counteracts Retinal Degeneration. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2020 Jun;36(5):311-319. doi: 10.1089/jop.2019.0163. Epub 2020 May 5.
7. COELHO, P.L.C.; AMPARO, J.A.O.; SILVA, A. B.; SILVA, K.C.; SOUZA, S.B.; BARBOSA, P.R.; LOPES, G.P.F. AND COSTA, S.L. (2019). Apigenin from *Croton betulaster* Müll restores the immune profile of microglia against

- glioma cells. *Phytotherapy Research*. V33, 3191-3202. Doi.org/10.1002/ptr.6491.
8. CUNHA C.; GOMES, C.; VAZ, A.R.; BRITES, D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. Hindawi Publishing Corporation. *Mediators of Inflammation*. V.2016. Doi.org/10.1155/2016/6986175.
 9. DA SILVA, A B et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chemico-Biological Interactions*, v. 274, p. 89-99, 2017.
 10. DA SILVA, A. B.; et al. (2019). The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving anti-glioma activity. *Brain, Behavior, and Immunity*. V. 85, 170-185
 11. DE ALMEIDA MMA, PIEROPAN F, DE MATTOS OLIVEIRA L, DOS SANTOS JUNIOR MC, DAVID JM, DAVID JP, DA SILVA VDA, DOS SANTOS SOUZA C, COSTA SL, BUTT AM. The flavonoid agathisflavone modulates the microglial neuroinflammatory response and enhances remyelination. *Pharmacol Res*. 2020 Sep;159:104997. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104997. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32534098; PMCID: PMC7482432.
 12. DE ALMEIDA MMA, SOUZA CDS, DOURADO NS, DA SILVA AB, FERREIRA RS, DAVID JM, DAVID JP, COSTA MFD, DA SILVA VDA, BUTT AM, COSTA SL. Phytoestrogen Agathisflavone Ameliorates Neuroinflammation-Induced by LPS and IL-1 β and Protects Neurons in Cocultures of Glia/Neurons. *Biomolecules*. 2020 Apr 7;10(4):562. doi: 10.3390/biom10040562.
 13. DE FELICE, F. G., WU, D., LAMBERT, M. P., FERNANDEZ, S. J., VELASCO, P. T., LACOR, P. N., et al. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. *Neurobiol. Aging* 29, 1334–1347. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029
 14. DELLA BIANCA, V.; DUSI, S.; BIANCHINI, E.; DAL PRÁ, I.; ROSSI, F.; A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 15493-15499, 1999.
 15. DICKSON, D.W et al. Microglial and Cytokines in Neurological Diseases, with special reference to Aids and Alzheimer's Disease. *Glia*. v. 7, p.75-83, 1993.
 16. DO NASCIMENTO RP, DOS SANTOS BL, AMPARO JAO, SOARES JRP, DA SILVA KC, SANTANA MR, ALMEIDA ÁMAN, DA SILVA VDA, COSTA MFD, ULRICH H, MOURA-NETO V, LOPES GPF, COSTA SL. Neuroimmunomodulatory Properties of Flavonoids and Derivates: A Potential Action as Adjuvants for the Treatment of Glioblastoma. *Pharmaceutics*. 2022 Jan 4;14(1):116. doi: 10.3390/pharmaceutics14010116.
 17. DOS SANTOS BL, DOS SANTOS CC, SOARES JRP, DA SILVA KC, DE OLIVEIRA JVR, PEREIRA GS, DE ARAÚJO FM, COSTA MFD, DAVID JM, DA SILVA VDA, BUTT AM, COSTA SL. The Flavonoid Agathisflavone Directs Brain Microglia/Macrophages to a Neuroprotective Anti-Inflammatory and Antioxidant State via Regulation of NLRP3 Inflammasome. *Pharmaceutics*. 2023 May 5;15(5):1410. doi: 10.3390/pharmaceutics15051410.
 18. DOURADO, N.S.; SOUZA, C.D.S.; DE ALMEIDA, M.M.A.; BISPO DA SILVA, A.; DOS SANTOS, B.L.; SILVA, V.D.A.; DE ASSIS, A.M.; DA SILVA, J.S.; SOUZA, D.O.; COSTA, M.F.D.; BUTT, A.M.; COSTA, S.L.

- Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in *in vitro* Models of Neuroinflammation Associated With Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2020 May 15;12:119.
19. FAN Z, ZHANG W, CAO Q, ZOU L, FAN X, QI C, YAN Y, SONG B, WU B. JAK2/STAT3 pathway regulates microglia polarization involved in hippocampal inflammatory damage due to acute paraquat exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Mar 3;234:113372. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113372.
 20. GUEDES J. R., CUSTÓDIA C. M., SILVA R. J., DE ALMEIDA L. P., DE LIMA M. C. P., CARDOSO A. L. (2014). Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 23, 6286–6301. 10.1093/hmg/ddu348
 21. GUO J, YANG P, LI YF, TANG JF, HE ZX, YU SG, YIN HY. MicroRNA: Crucial modulator in purinergic signalling involved diseases. *Purinergic Signal.* 2023 Mar;19(1):329-341. doi: 10.1007/s11302-022-09840-y.
 22. GUO Y, HONG W, WANG X, ZHANG P, KÖRNER H, TU J, WEI W. MicroRNAs in Microglia: How do MicroRNAs Affect Activation, Inflammation, Polarization of Microglia and Mediate the Interaction Between Microglia and Glioma? *Front Mol Neurosci.* 2019 May 10;12:125. doi: 10.3389/fnmol.2019.00125.
 23. HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989, 119, 203–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).
 24. HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec 2002. ISSN 0163-7258 0163-7258.
 25. HU HQ, SUN LG, GUO WJ. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1. *Int J Biol Markers.* 2016 Jul 30;31(3):e270-5. doi: 10.5301/jbm.5000194.
 26. INOUE K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(19):3074-80. doi: 10.1007/s00018-008-8210-3.
 27. JUNN E, MOURADIAN MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012 Feb;133(2):142-50. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.002. Epub 2011 Oct 8.
 28. KARTHIKEYAN A, GUPTA N, TANG C, MALLILANKARAMAN K, SILAMBARASAN M, SHI M, LU L, ANG BT, LING EA, DHEEN ST. Microglial SMAD4 regulated by microRNA-146a promotes migration of microglia which support tumor progression in a glioma environment. *Oncotarget.* 2018 May 18;9(38):24950-24969. doi: 10.18632/oncotarget.25116.
 29. KIM HJ, AJIT D, PETERSON TS, WANG Y, CAMDEN JM, GIBSON WOOD W, SUN GY, ERB L, PETRIS M, WEISMAN GA. Nucleotides released from A β ₁₋₄₂-treated microglial cells increase cell migration and A β ₁₋₄₂ uptake through P2Y₂ receptor activation. *J Neurochem.* 2012 Apr;121(2):228-38. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x.
 30. KIM SJ, SON TG, PARK HR, PARK M, KIM MS, KIM HS, CHUNG HY, MATTSON MP, LEE J. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *J Biol Chem.* 2008 May 23;283(21):14497-505. doi: 10.1074/jbc.M708373200. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362141; PMCID: PMC2386914.

31. KORZHEVSKII, D.E. AND KIRIK, O.V. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 46, No. 3, March, 2016.
32. KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, v. 2013, p. 162750, 2013. ISSN 1537-744x.
33. LI P, XU Y, WANG B, HUANG J, LI Q. miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate A β -induced neurotoxicity through targeting BACE1. *J Neurol Sci*. 2020 Jun 15;413:116793. doi: 10.1016/j.jns.2020.116793.
34. LI YY, CUI JG, DUA P, POGUE AI, BHATTACHARJEE S, LUKIW WJ. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neuroscience Letters*. 2011;499:109–113.
35. LIU J, WANG F, LUO F. The Role of JAK/STAT Pathway in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms. *Biomolecules*. 2023 Jan 6;13(1):119. doi: 10.3390/biom13010119.
36. LOURENCO, M. V., CLARKE, J. R., FROZZA, R. L., BOMFIM, T. R., FORNY-GERMANO, L., BATISTA, A. F., et al. (2013). TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab*. 18, 831–843. doi: 10.1016/j.cmet. 2013.11.002
37. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
38. MECHA, M.; IÑIGO, P.M.; MESTRE, L.; HERNANGÓMEZ, M.; BORRELL, J.; GUAZA, C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protoc. Exch*. 2011. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.218>.
39. MEDRANO-JIMÉNEZ E, MEZA-SOSA KF, URBÁN-ARAGÓN JA, SECUNDINO I, PEDRAZA-ALVA G, PÉREZ-MARTÍNEZ L. Microglial activation in Alzheimer's disease: The role of flavonoids and microRNAs. *J Leukoc Biol*. 2022 Jul;112(1):47-77. doi: 10.1002/JLB.3MR1021-531R.
40. MEDRANO-JIMÉNEZ E, MEZA-SOSA KF, URBÁN-ARAGÓN JA, SECUNDINO I, PEDRAZA-ALVA G, PÉREZ-MARTÍNEZ L. Microglial activation in Alzheimer's disease: The role of flavonoids and microRNAs. *J Leukoc Biol*. 2022 Jul;112(1):47-77. doi: 10.1002/JLB.3MR1021-531R.
41. MENDES, C.C.; BAHIA, M.V.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia* 2000, 71, 205–207. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(99\)00145-8](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00145-8).
42. MERAZ-RIOS A. M et al. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers In Integrative Neuroscience*. v.7, p-1-15, 2013.
43. MORAES, C. A. et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1 β : Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol*, v. 52, n. 1, p. 653-63, Aug 2015. ISSN 0893-7648.
44. MURRAY PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2623-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2623.
45. PAULSEN, B.S.; SOUZA, C.S.; CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M.H.; BAHIA, M.V ; COSTA, S.L.; BORGES, H.L.; REHEN, S.K. ; Agathisflavone enhances retinoic acid induced neurogenesis and its receptors in pluripotent stem cells. *Stem Cells Development*. v. 20, p. 1711-1721, 2011

46. PENA-PHILIPPIDES JC, CABALLERO-GARRIDO E, LORDKIPANIDZE T, ROITBAK T. In vivo inhibition of miR-155 significantly alters post-stroke inflammatory response. *J Neuroinflammation*. 2016 Nov 9;13(1):287. doi: 10.1186/s12974-016-0753-x.
47. PENG-FEI H, A-RU-NA, HUI C, HONG-YU W, JIN-SHAN C. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protects bovine endometrial tissue against LPS-induced inflammatory injury via JAK2/STAT3 pathway and COX-2 derived prostaglandin E₂. *Eur J Pharmacol*. 2021 Jun 5;900:174067. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174067.
48. PONOMAREV ED, VEREMEYKO T, WEINER HL. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia* 61: 91-103, 2013.
49. RADESÄTER, A. C., JOHANSSON, S., OBERG, C., AND LUTHMAN, J. The vitamin-E analog trolox and the NMDA antagonist MK-801 protect pyramidal neurons in hippocampal slice cultures from IL-1 β -induced neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 2003, 5, 433–442. doi: 10.1007/bf03033173
50. SABA R, GUSHUE S, HUZAREWICH RL, MANGUIAT K, MEDINA S, ROBERTSON C, BOOTH SA. MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS One*. 2012; 7(2):e30832. doi: 10.1371/journal.pone.0030832.
51. SABOGAL-GUAQUETA, A. M. et al. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, v. 93, p. 134-45, Jun 2015. ISSN 0028-3908.
52. SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
53. SILBER J, LIM DA, PETRITSCH C, PERSSON AI, MAUNAKEA AK, YU M, VANDENBERG SR, GINZINGER DG, JAMES CD, COSTELLO JF, BERGERS G, WEISS WA, ALVAREZ-BUYLLA A, HODGSON JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008 Jun 24;6:14. doi: 10.1186/1741-7015-6-14.
54. SINGH, D. P.; CHOPRA, K. Flavocoxid, dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, exhibits neuroprotection in rat model of ischaemic stroke. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 120, p. 33-42, May 2014. ISSN 0091-3057.
55. SOUZA, C.S.; GRANGEIRO, M.S.; PEREIRA, E.P.L.; SANTOS, C.C.; SILVA, A.B.; SAMPAIO, G.P.; FIGUEIREDO, D.D.R.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; SILVA, V.D.A.; BUTT, A.M.; COSTA, S.L. (2018). Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology*, V.65, 85-97. Doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001.
56. SPOHR, T.C.L.S.; STIPURSKY, J.; SASAKI, A.C.; BARBOSA, P.R.; MARTINS; V, BENJAMIM, C.F., ROQUE, N.F., COSTA, S.L., GOMES, F.C.A. Effects of the flavonoid casticin from Brazilian *Croton betulaster* in cerebral cortical progenitors in vitro: Direct and indirect action through astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, v.3. p. 41-530, 2009.

57. TAGANOV KD, BOLDIN MP, CHANG KJ, BALTIMORE D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481–12486.
58. VERKHRATSKY & BUTT, 2007. *Glial Neurobiology: A Textbook*, Wiley, Chichester, 2007.
59. VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, n. 1, p. 17-21, Jan 2005. ISSN 1357-2725.
60. WANG H, LI Z, GAO J, LIAO Q. Circular RNA circPTK2 regulates oxygen-glucose deprivation-activated microglia-induced hippocampal neuronal apoptosis via miR-29b-SOCS-1-JAK2/STAT3-IL-1 β signaling. *Int J Biol Macromol*. 2019 May 15;129:488-496. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.041. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30742923.)
61. WANG, S. W. et al. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*, v. 33, n. 3, p. 482-90, Jun 2012. ISSN 0161-813x.
62. WEISMAN GA, AJIT D, GARRAD R, PETERSON TS, WOODS LT, THEBEAU C, CAMDEN JM, ERB L. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):559-78. doi: 10.1007/s11302-012-9307-6.
63. WEISMAN GA, WANG M, KONG Q, CHORNA NE, NEARY JT, SUN GY, GONZÁLEZ FA, SEYE CI, ERB L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2005;31(1-3):169-83. doi: 10.1385/MN:31:1-3:169.
64. WOLF, S.A.; BODDEKE, H.W.G.M. AND KETTENMANN, H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol*. 2017. 79:619–43.
65. WU D, WANG C. miR-155 Regulates the Proliferation of Glioma Cells Through PI3K/AKT Signaling. *Front Neurol*. 2020 Apr 28;11:297. doi: 10.3389/fneur.2020.00297;
66. YANG Z., ZHONG L., ZHONG S., XIAN R., YUAN B. (2015). MiR-203 protects microglia mediated brain injury by regulating inflammatory responses via feedback to MyD88 in ischemia. *Mol. Immunol*. 65, 293–301.
67. YIN H., SONG S., PAN X. (2017). Knockdown of miR-155 protects microglia against LPS-induced inflammatory injury via targeting RACK1: a novel research for intracranial infection. *J. Inflamm*. 14:17. 10.1186/s12950-017-0162-7
68. ZHANG Z, WANG J, LI J, WANG X, SONG W. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4. *Biomed Pharmacother*. (2018) 97:511–7. 10.1016/j.biopha.2017.09.143;
69. ZHANG, X. et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One*, v. 9, n. 9, p. e107072, 2014. ISSN 1932-6203.
70. ZHONG Y, GU L, YE Y, ZHU H, PU B, WANG J, LI Y, QIU S, XIONG X, JIAN Z. JAK2/STAT3 Axis Intermediates Microglia/Macrophage Polarization During Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Neuroscience*. 2022 Aug 1;496:119-128. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.05.016.

6. CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho, concluímos que o flavonoide agatisflavona:

- I. Modulou a morfologia microglial, contribuindo para a proliferação celular e prevalência de microglias com morfologia mais ramificadas características de células quiescentes/vigilantes;
- II. Modulou a ativação microglial para um perfil antiinflamatório, reduzindo expressão de marcadores inflamatórios como CD68 e reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios como NO, IL-6, IL1 β , TNF e o complexo protéico NLRP3;
- III. Apresentou, a partir das análises de docking molecular, potencial em modular o inflamossoma NLRP3, inibindo sua ativação a partir da ligação ao seu domínio de ativação NACHT;
- IV. Apresentou efeito neuroprotetor, reduzindo toxicidade e morte neuronal induzida por LPS em modelo de cultura com células PC12 diferenciadas em neurônios;
- V. Regulou negativamente a expressão dos microRNAs miR146a e miR155, envolvidos na ativação microglial e neuroinflamação, em cultura de células microgliais de linhagem humana;
- VI. Regulou negativamente a via de sinalização STAT3, reduzindo a expressão de pSTAT3, envolvida na expressão de citocinas inflamatórias;
- VII. Regulou negativamente a concentração de cálcio citosólico microglial, via receptor purinérgico, sugerindo efeito do flavonoide no antagonismo de receptores purinérgicos.

Assim, a partir dos efeitos antiinflamatórios e neuroprotetor aqui descritos e delineados na figura 3 abaixo, o flavonoide agatisflavona apresenta-se como potencial candidato a agente terapêutico para doenças neurodegenerativas.

6.1 Síntese conclusiva

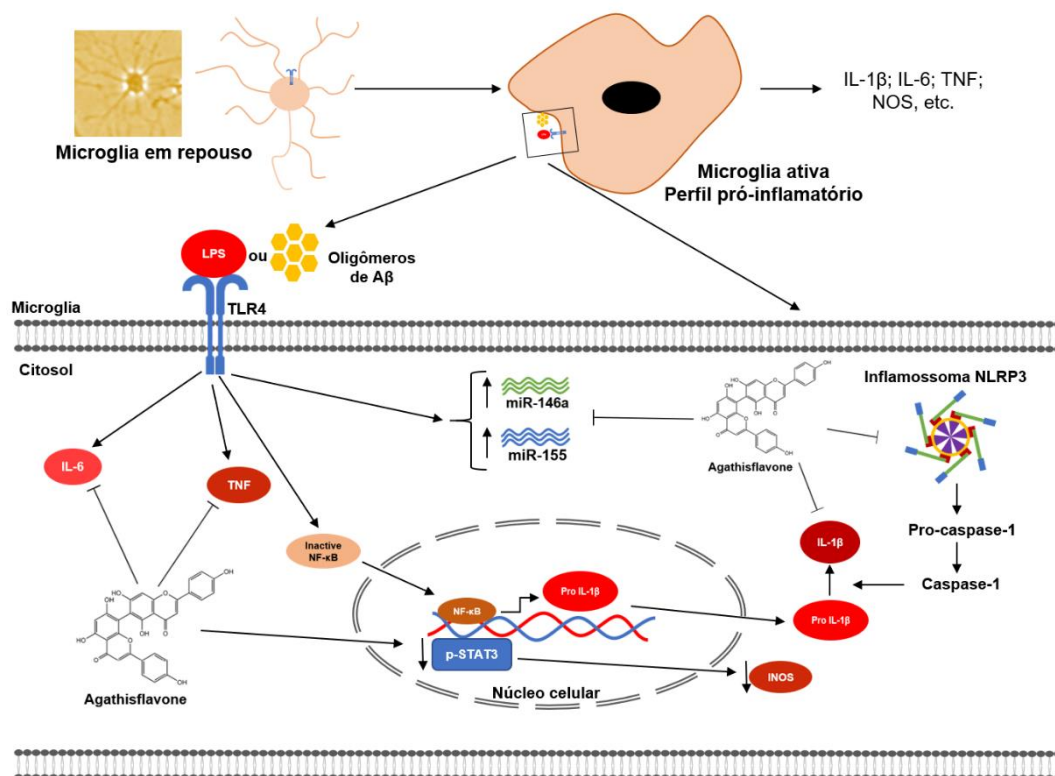


Figura 3. Inibição de vias inflamatórias por agatisflavona em células microgliais. Esquema representativo das vias moleculares que levam a um processo inflamatório na microglia iniciado por oligômeros A β ou por LPS. A estimulação de células microgliais com oligômeros A β ou com LPS demonstrou regular citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF, bem como regular miR-146a e miR-155. As propriedades anti-inflamatórias do flavonoide agatisflavona incluem a redução de citocinas pró-inflamatórias e a regulação negativa de STAT3, NLRP3 e mi-RNAs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. AALINKEEL, R.; MANGUM, C.S.; ABOU-JAOUDE, E.; REYNOLDS, J.L.; LIU, M.; SUNDQUIST, K.; PARIKH, N.U.; CHAVES, L.D.; MAMMEN, M.J.; SCHWARTZ, S.A.; *et al.* Galectin-1 Reduces Neuroinflammation via Modulation of Nitric Oxide-Arginase Signaling in HIV-1 Transfected Microglia: A Gold Nanoparticle-Galectin-1 “Nanoplex” a Possible Neurotherapeutic? *J. Neuroimmune Pharm.* 2017, 12, 133–151.
2. ABUBAKAR MB, SANUSI KO, UGUSMAN A, MOHAMED W, KAMAL H, IBRAHIM NH, KHOO CS, KUMAR J. Alzheimer's Disease: An Update and Insights Into Pathophysiology. *Front Aging Neurosci.* 2022 Mar 30;14:742408. doi: 10.3389/fnagi.2022.742408.
3. ALLEN, N., BARRES, B. Glia: more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677 (2009). <https://doi.org/10.1038/457675a>
4. ALOI MS, PRATER KE, SÁNCHEZ REA, BECK A, PATHAN JL, DAVIDSON S, WILSON A, KEENE CD, DE LA IGLESIA H, JAYADEV S, GARDEN GA. Microglia specific deletion of miR-155 in Alzheimer's disease mouse models reduces amyloid- β pathology but causes hyperexcitability and seizures. *J Neuroinflammation.* 2023 Mar 7;20(1):60. doi: 10.1186/s12974-023-02745-6.
5. ALOISI, F. Immune Function of Microglia. *Glia.* v. 36, p. 165-179, 2001.
6. ANTONIOLI L, BLANDIZZI C, PACHER P, HASKÓ G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Pharmacol Rev.* 2019 Jul;71(3):345-382. doi: 10.1124/pr.117.014878.
7. ARAKI T, IKEGAYA Y, KOYAMA R. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. *Eur J Neurosci.* 2021 Sep;54(5):5880-5901. doi: 10.1111/ejn.14969. Epub 2020 Sep 21.
8. ARBO BD, ANDRÉ-MIRAL C, NASRE-NASSER RG, SCHIMITH LE, SANTOS MG, COSTA-SILVA D, MUCCILLO-BAISCH AL, HORT MA. Resveratrol Derivatives as Potential Treatments for Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2020 Apr 17;12:103. doi: 10.3389/fnagi.2020.00103.
9. ASCHNER M, ALLEN JW, KIMELBERG HK, LOPACHIN RM, STREIT WJ. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:151-73. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.151.
10. BAGCHI S, LIAO Z, GONZALEZ FA, CHORNA NE, SEYE CI, WEISMAN GA, ERB L. The P2Y2 nucleotide receptor interacts with α v integrins to activate Go and induce cell migration. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39050-7. doi: 10.1074/jbc.M504819200.
11. BANERJEE S, BHAT MA. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:235-58. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345.
12. BEKING, K.; VIEIRA, A. Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition*, v.13, p. 1403-1409, 2010.
13. BELLINGHAM, S.A.; GUO, B.B.; COLEMAN, B.M.; HILL, A.F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* 2012, 3, 124.
14. BENAMEUR T, SOLETI R, PORRO C. The Potential Neuroprotective Role of Free and Encapsulated Quercetin Mediated by miRNA against Neurological Diseases. *Nutrients.* 2021 Apr 16;13(4):1318. doi: 10.3390/nu13041318.

15. BISPO DA SILVA A, CERQUEIRA COELHO PL, ALVES OLIVEIRA AMPARO J, ALVES DE ALMEIDA CARNEIRO MM, PEREIRA BORGES JM, DOS SANTOS SOUZA C, DIAS COSTA MF, MECHA M, GUAZA RODRIGUEZ C, AMARAL DA SILVA VD, LIMA COSTA S. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chem Biol Interact.* 2017 Aug 25;274:89-99. doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.004.
16. BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 1958, 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
17. BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 39, n. 1, p. 3-18, Feb 2013. ISSN 0305-1846.
18. BRAMBILLA, R.; BRACCHI-RICARD, V.; HU, W.H.; FRYDEL, B.; BRAMWELL, A.; KARMALLY, S.; GREEN, E.J.; BETHEA, J.R. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 2005, 202, 145–156.
19. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.
20. BRITES, D. Regulatory function of microRNAs in microglia. *Glia* 2020, 68, 1631–1642. <https://doi.org/10.1002/glia.23846>.
21. CAPRINDA M, KUBATKA P, GAZDIKOVA K, GASPAROVA I, VALENTOVA V, STOLLAROVA N, LA ROCCA G, KOBLYIAK N, DRAGASEK J, MOZOS I, PROSECKY R, SINISCALCO D, BÜSSELBERG D, RODRIGO L, KRUZLIAK P. Immunomodulatory effects of stem cells: Therapeutic option for neurodegenerative disorders. *Biomed Pharmacother.* 2017 Jul;91:60-69. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.034
22. CHAVES OA, LIMA CR, FINTELMAN-RODRIGUES N, SACRAMENTO CQ, DE FREITAS CS, VAZQUEZ L, TEMEROZO JR, ROCHA MEN, DIAS SSG, CARELS N, BOZZA PT, CASTRO-FARIA-NETO HC, SOUZA TML. Agathisflavone, a natural biflavonoid that inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting its proteases. *Int J Biol Macromol.* 2022 Dec 1;222(Pt A):1015-1026. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.204.
23. CHEN L, DONG R, LU Y, ZHOU Y, LI K, ZHANG Z, PENG M. MicroRNA-146a protects against cognitive decline induced by surgical trauma by suppressing hippocampal neuroinflammation in mice. *Brain Behav Immun.* 2019 May; 78:188-201. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.020.
24. CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, v. 11, p. 98, Jun 03 2014. ISSN 1742-2094.
25. CHOI, S.M.; KIM, B.C.; CHO, Y.H.; CHOI, K.H.; CHANG, J.; PARK, M.S.; KIM, M.K.; CHO, K.H.; KIM, J.K.; Effects of flavonoids compounds on b-amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons, *Neuroscience*, v.50, p. 45-51, 2014.
26. CHUMSAKUL O, WAKAYAMA K, TSUHAKO A, BABA Y, TAKAI Y, KUROSE T, HONMA Y, WATANABE S. Apigenin Regulates Activation of Microglia and Counteracts Retinal Degeneration. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2020 Jun;36(5):311-319. doi: 10.1089/jop.2019.0163. Epub 2020 May 5.
27. COELHO, P. L. C. et al. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, p. 34-43, 2016. ISSN 0102-695X.

28. COELHO, P.L.C.; AMPARO, J.A.O.; SILVA, A.B.; SILVA, K.C.; SOUZA, S.B.; BARBOSA, P.R.; LOPES, G.P.F.; COSTA, S.L. Apigenin from *Croton betulaster* Müll restores the immune profile of microglia against glioma cells. *Phytother. Res.* 2019, 33, 3191–3202. <https://doi.org/10.1002/ptr.6491>.
29. COLL, R.C.; HILL, J.R.; DAY, C.J.; ZAMOSHNIKOVA, A.; BOUCHER, D.; MASSEY, N.L.; CHITTY, J.; FRASER, J.A.; JENNINGS, M.P.; ROBERTSON, A.A.B.; et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 2019, 15, 556–559. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>.
30. COLOVIĆ MB, KRSTIĆ DZ, LAZAREVIĆ-PAŠTI TD, BONDŽIĆ AM, VASIĆ VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013 May;11(3):315-35. doi: 10.2174/1570159X11311030006.
31. COMBES, V.; GUILLEMIN, G.J.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E.R. The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends in Parasitology.* V.8, p. 9-311, 2012.
32. COSTA SL, SILVA VD, DOS SANTOS SOUZA C, SANTOS CC, PARIS I, MUÑOZ P, SEGURA-AGUILAR J. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotox Res.* 2016 Jul;30(1):41-52. doi: 10.1007/s12640-016-9600-1.
33. CUNHA C, GOMES C, VAZ AR, BRITES D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:6986175. doi: 10.1155/2016/6986175.
34. D'AMELIO, M.; CAVALLUCCI, V.; CECCONI, F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010, 17, 1104–1114. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.180>.
35. DA SILVA, A.B.; CERQUEIRA COELHO, P.L.; AMPARO, J.A.O.; DE ALMEIDA CARNEIRO, M.M.A.; BORGES, J.M.P.; DOS SANTOS SOUZA, C.; DE FÁTIMA DIAS COSTA, M.; MECHA, M.; RODRIGUEZ, C.G.; DA SILVA, V.D.A.; et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chem. Biol. Interact.* 2017, 274, 89–99.
36. DA SILVA, A.B.; COELHO, P.L.C.; OLIVEIRA, M.D.N.; OLIVEIRA, J.L.; AMPARO, J.A.O.; DA SILVA, K.C.; SOARES, J.R.P.; PITANGA, B.P.S.; SOUZA, C.; LOPES, G.P.D.F.; et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. *Brain Behav. Immun.* 2019, 85, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.003>.
37. DE ALMEIDA MMA, PIEROPAN F, DE MATTOS OLIVEIRA L, DOS SANTOS JUNIOR MC, DAVID JM, DAVID JP, DA SILVA VDA, DOS SANTOS SOUZA C, COSTA SL, BUTT AM. The flavonoid agathisflavone modulates the microglial neuroinflammatory response and enhances remyelination. *Pharmacol Res.* 2020 Sep;159:104997. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104997. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32534098; PMCID: PMC7482432.
38. DE ALMEIDA MMA, SOUZA CDS, DOURADO NS, DA SILVA AB, FERREIRA RS, DAVID JM, DAVID JP, COSTA MFD, DA SILVA VDA, BUTT AM, COSTA SL. Phytoestrogen Agathisflavone Ameliorates Neuroinflammation-Induced by LPS and IL-1 β and Protects Neurons in Cocultures of Glia/Neurons. *Biomolecules.* 2020 Apr 7;10(4):562. doi: 10.3390/biom10040562.
39. DE FELICE, F. G., WU, D., LAMBERT, M. P., FERNANDEZ, S. J., VELASCO, P. T., LACOR, P. N., et al. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. *Neurobiol. Aging* 29, 1334–1347. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029

40. DEKKER, C.; MATTES, H.; WRIGHT, M.; BOETTCHER, A.; HINNIGER, A.; HUGHES, N.; KAPPS-FOUTHIER, S.; EDER, J.; ERBEL, P.; STIEFL, N.; *et al.* Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. *J. Mol. Biol.* 2021, *433*, 167309.
41. DELLA BIANCA, V.; DUSI, S.; BIANCHINI, E.; DAL PRÁ, I.; ROSSI, F.; A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 15493-15499, 1999.
42. DIAS GP, CAVEGN N, NIX A, DO NASCIMENTO BEVILAQUA MC, STANGL D, ZAINUDDIN MS, NARDI AE, GARDINO PF, THURET S. The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:541971. doi: 10.1155/2012/541971.
43. DICKSON, D.W *et al.* Microglial and Cytokines in Neurological Diseases, with special reference to Aids and Alzheimer's Disease. *Glia.* v. 7, p.75-83, 1993.
44. DO NASCIMENTO RP, DOS SANTOS BL, AMPARO JAO, SOARES JRP, DA SILVA KC, SANTANA MR, ALMEIDA ÁMAN, DA SILVA VDA, COSTA MFD, ULRICH H, MOURA-NETO V, LOPES GPF, COSTA SL. Neuroimmunomodulatory Properties of Flavonoids and Derivates: A Potential Action as Adjuvants for the Treatment of Glioblastoma. *Pharmaceutics.* 2022 Jan 4;14(1):116. doi: 10.3390/pharmaceutics14010116.
45. DOS SANTOS G, KUTUZOV MA, RIDGE KM. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012 Oct 15;303(8):L627-33. doi: 10.1152/ajplung.00225.2012.
46. DOTY KR, GUILLOT-SESTIER MV, TOWN T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? *Brain Res.* 2015 Aug 18;1617:155-73. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.008.
47. DOURADO NS, SOUZA CDS, DE ALMEIDA MMA, BISPO DA SILVA A, DOS SANTOS BL, SILVA VDA, DE ASSIS AM, DA SILVA JS, SOUZA DO, COSTA MFD, BUTT AM, COSTA SL. Neuroimmunomodulatory and Neuroprotective Effects of the Flavonoid Apigenin in *in vitro* Models of Neuroinflammation Associated With Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2020 May 15;12:119. doi: 10.3389/fnagi.2020.00119.
48. DUNCAN, J.A.; BERGSTRALH, D.T.; WANG, Y.; WILLINGHAM, S.B.; YE, Z.; ZIMMERMANN, A.G.; TING, J.P.-Y. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, *104*, 8041–8046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611496104>.
49. EBRAHIMPOUR S, ESMAEILI A, DEGHANIAN F, BEHESHTI S. Effects of quercetin-conjugated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles on learning and memory improvement through targeting microRNAs/NF-κB pathway. *Sci Rep.* 2020 Sep 15;10(1):15070. doi: 10.1038/s41598-020-71678-4.
50. ERLANDSSON HARRIS H, ANDERSSON U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol.* 2004 Jun;34(6):1503-12. doi: 10.1002/eji.200424916.
51. EVANS JA, MENDONCA P, SOLIMAN KFA. Neuroprotective Effects and Therapeutic Potential of the Citrus Flavonoid Hesperetin in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients.* 2022 May 26;14(11):2228. doi: 10.3390/nu14112228.
52. FAN Z, ZHANG W, CAO Q, ZOU L, FAN X, QI C, YAN Y, SONG B, WU B. JAK2/STAT3 pathway regulates microglia polarization involved in hippocampal

- inflammatory damage due to acute paraquat exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022 Mar 3;234:113372. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113372.
53. FERNANDO, P.; BRUNETTE, S.; MEGENEY, L.A. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase-3 activity. *FASEB J.* 2005, 19, 1671–1673. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2981fje>.
 54. FERRARI D, BIANCHI N, ELTZSCHIG HK, GAMBARI R. MicroRNAs Modulate the Purinergic Signaling Network. *Trends Mol Med.* 2016 Oct;22(10):905-918. doi: 10.1016/j.molmed.2016.08.006.
 55. FERREIRA-VIEIRA TH, GUIMARAES IM, SILVA FR, RIBEIRO FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(1):101-15. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
 56. FORMICA JV, REGELSON W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995 Dec;33(12):1061-80. doi: 10.1016/0278-6915(95)00077-1.
 57. FRÜHBEIS, C.; FRÖHLICH, D.; KRÄMER-ALBERS, E.-M. Emerging roles of exosomes in neuron–glia communication. *Front. Physiol.* 2012, 3, 119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>.
 58. FRÜHBEIS, C.; FRÖHLICH, D.; KUO, W.P.; KRÄMER-ALBERS, E.-M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front. Cell. Neurosci.* 2013, 7, 182. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00182>.
 59. FUKUYAMA, R. et al. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur. Neurol.*, v.46, n.1, p.35-8, 2001.
 60. GÖK, H.N.; ORHAN, N.; ÖZÜPEK, B.; PEKACAR, S.; SELVI, Ş.N.; ORHAN, D.D. Standardization of *Juniperus macrocarpa* Sibth. & Sm. and *Juniperus excelsa* M. Bieb. Extracts with Carbohydrate Digestive Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities. *Iran. J. Pharm. Res.* 2021, 20, 441–455.
 61. GOMES FCA, TORTELLI VP, DINIZ L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estud av [Internet].* 2013;27(77):61–84. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100006>
 62. GRALLE M, FERREIRA ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol.* 2007 May;82(1):11-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.02.001
 63. GUEDES J. R., CUSTÓDIA C. M., SILVA R. J., DE ALMEIDA L. P., DE LIMA M. C. P., CARDOSO A. L. (2014). Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 23, 6286–6301. 10.1093/hmg/ddu348
 64. GUO J, YANG P, LI YF, TANG JF, HE ZX, YU SG, YIN HY. MicroRNA: Crucial modulator in purinergic signalling involved diseases. *Purinergic Signal.* 2023 Mar;19(1):329-341. doi: 10.1007/s11302-022-09840-y.
 65. GUO Y, HONG W, WANG X, ZHANG P, KÖRNER H, TU J, WEI W. MicroRNAs in Microglia: How do MicroRNAs Affect Activation, Inflammation, Polarization of Microglia and Mediate the Interaction Between Microglia and Glioma? *Front Mol Neurosci.* 2019 May 10;12:125. doi: 10.3389/fnmol.2019.00125.
 66. HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989, 119, 203–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).

67. HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec 2002. ISSN 0163-7258 0163-7258.
68. HENEKA MT, KUMMER MP, LATZ E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jul;14(7):463-77. doi: 10.1038/nri3705.
69. HIRRLINGER, J.; SCHULZ, J.B.; DRINGEN, R. Glutathione release from cultured brain cells: Multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J. Neurosci. Res.* 2002, 69, 318–326. <https://doi.org/10.1002/jnr.10308>.
70. HONG H, LI Y, SU B. Identification of Circulating miR-125b as a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease in APP/PS1 Transgenic Mouse. *J Alzheimers Dis.* 2017;59(4):1449-1458. doi: 10.3233/JAD-170156.
71. HU HQ, SUN LG, GUO WJ. Decreased miRNA-146a in glioblastoma multiforme and regulation of cell proliferation and apoptosis by target Notch1. *Int J Biol Markers.* 2016 Jul 30;31(3):e270-5. doi: 10.5301/jbm.5000194.
72. INOUE K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(19):3074-80. doi: 10.1007/s00018-008-8210-3.
73. INOUE K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(19):3074-80. doi: 10.1007/s00018-008-8210-3.
74. ISLAM MT, ZIHAD SMNK, RAHMAN MS, SIFAT N, KHAN MR, UDDIN SJ, ROUF R. Agathisflavone: Botanical sources, therapeutic promises, and molecular docking study. *IUBMB Life.* 2019 Sep;71(9):1192-1200. doi: 10.1002/iub.2053.
75. ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K.; NAKAJIMA, K.; FUKUUCHI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.* 1998, 57, 1–9.
76. JONVEAUX T, ROUAUD O, CECCALDI M, FÉLICIAN O, GODEFROY O, FORMAGLIO M, CROISILE B, AURIACOMBE S, CHAMARD L, VINCENT JL, SAUVÉE M, MARELLI-TOSI C, GABELLE A, OZSANCAK C, PARIENTE J, PAQUET C, HANNEQUIN D, CAMPION D; collaborators of the CNR-MAJ project. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.* 2017 Mar 28;14(3):e1002270. doi: 10.1371/journal.pmed
77. JUNN E, MOURADIAN MM. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012 Feb;133(2):142-50. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.002. Epub 2011 Oct 8.
78. KARTHIKEYAN A, GUPTA N, TANG C, MALLILANKARAMAN K, SILAMBARASAN M, SHI M, LU L, ANG BT, LING EA, DHEEN ST. Microglial SMAD4 regulated by microRNA-146a promotes migration of microglia which support tumor progression in a glioma environment. *Oncotarget.* 2018 May 18;9(38):24950-24969. doi: 10.18632/oncotarget.25116.
79. KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*, v. 1, n. 1, 2016.
80. KETTENMANN H, VERKHRATSKY A. Neuroglia, der lebende Nerven Kitt [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2011 Oct;79(10):588-97. German. doi: 10.1055/s-0031-1281704.
81. KETTENMANN, H.; HANISCH, U.; NODA, N. AND VERKHRATSKY, A. Physiology of Microglia. *Physiol Rev* 91: 461–553, 2011.
82. KIM EJ, PARK SY, BAEK SE, JANG MA, LEE WS, BAE SS, KIM K, KIM CD. HMGB1 Increases IL-1 β Production in Vascular Smooth Muscle Cells via NLRP3

- Inflammasome. *Front Physiol.* 2018 Mar 28;9:313. doi: 10.3389/fphys.2018.00313
83. KIM HJ, AJIT D, PETERSON TS, WANG Y, CAMDEN JM, GIBSON WOOD W, SUN GY, ERB L, PETRIS M, WEISMAN GA. Nucleotides released from A β ₁₋₄₂ - treated microglial cells increase cell migration and A β ₁₋₄₂ uptake through P2Y₂ receptor activation. *J Neurochem.* 2012 Apr;121(2):228-38. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x.
 84. KIM SJ, SON TG, PARK HR, PARK M, KIM MS, KIM HS, CHUNG HY, MATTSON MP, LEE J. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *J Biol Chem.* 2008 May 23;283(21):14497-505. doi: 10.1074/jbc.M708373200. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362141; PMCID: PMC2386914.
 85. Kim, S.H.; Smith, C.J.; Van Eldik, L.J. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol. Aging* 2004, 25, 431–439.
 86. KIRDAJOVA D, ANDEROVA M. NG2 cells and their neurogenic potential. *Curr Opin Pharmacol.* 2020 Feb;50:53-60. doi: 10.1016/j.coph.2019.11.005.
 87. KÖLLIKER-FRERS R, UDOVIN L, OTERO-LOSADA M, KOBIEC T, HERRERA MI, PALACIOS J, RAZZITTE G, CAPANI F. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease. *Mediators Inflamm.* 2021 May 31;2021:9999146. doi: 10.1155/2021/9999146.
 88. KORZHEVSKII, D.E. AND KIRIK, O.V. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 46, No. 3, March, 2016.
 89. KUMAR A, FONTANA IC, NORDBERG A. Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2023 Feb;164(3):309-324. doi: 10.1111/jnc.15565.
 90. KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, v. 2013, p. 162750, 2013. ISSN 1537-744x.
 91. LANOISELÉE HM, NICOLAS G, WALLON D, ROVELET-LECRUX A, LACOUR M, ROUSSEAU S, RICHARD AC, PASQUIER F, ROLLIN-SILLAIRE A, MARTINAUD O, QUILLARD-MURAIN M, DE LA SAYETTE V, BOUTOLEAU-BRETONNIERE C, ETCHARRY-BOUYX F, CHAUVIRÉ V, SARAZIN M, LE BER I, EPELBAUM S, JONVEAUX T, ROUAUD O, CECCALDI M, FÉLICIAN O, GODEFROY O, FORMAGLIO M, CROISILE B, AURIACOMBE S, CHAMARD L, VINCENT JL, SAUVÉE M, MARELLI-TOSI C, GABELLE A, OZSANCAK C, PARIENTE J, PAQUET C, HANNEQUIN D, CAMPION D; collaborators of the CNR-MAJ project. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.* 2017 Mar 28;14(3):e1002270. doi: 10.1371/journal.pmed.1002270.
 92. LE W, WU J AND TANG Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Frente Mol. Neurosci.* 9:89, 2016. doi: 10.3389/fnmol.2016.00089
 93. LEE, D.C.; RIZER, J.; SELENICA, M.-L.B.; REID, P.; KRAFT, C.; JOHNSON, A.; BLAIR, L.; GORDON, M.N.; DICKEY, C.A.; MORGAN, D. LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J. Neuroinflamm.* 2010, 7, 56. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-56>.
 94. LENT, R. As unidades do Sistema Nervoso: Forma e Função de Neurônios e Gliócitos. In: Nova Atheneu editora. Cem Bilhões de Neurônios, Conceitos Fundamentais de Neurociências, São Paulo. p.65-95, 2005.

95. LI C, REN J, ZHANG M, WANG H, YI F, WU J, TANG Y. The heterogeneity of microglial activation and its epigenetic and non-coding RNA regulations in the immunopathogenesis of neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2022 Sep 6;79(10):511. doi: 10.1007/s00018-022-04536-3.
96. LI P, XU Y, WANG B, HUANG J, LI Q. miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate A β -induced neurotoxicity through targeting BACE1. *J Neurol Sci.* 2020 Jun 15;413:116793. doi: 10.1016/j.jns.2020.116793.
97. LI YY, CUI JG, DUA P, POGUE AI, BHATTACHARJEE S, LUKIWI WJ. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neuroscience Letters.* 2011;499:109–113.
98. LIU J, WANG F, LUO F. The Role of JAK/STAT Pathway in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms. *Biomolecules.* 2023 Jan 6;13(1):119. doi: 10.3390/biom13010119.
99. LOPES ANDRADE AW, DIAS RIBEIRO FIGUEIREDO D, TOREQUL ISLAM M, VIANA NUNES AM, DA CONCEIÇÃO MACHADO K, DA CONCEIÇÃO MACHADO K, UDDIN SJ, AHMED SHILPI J, ROUF R, DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE AA, DAVID JM, MUBARAK MS, PEREIRA COSTA J. Toxicological evaluation of the biflavonoid, agathisflavone in albino Swiss mice. *Biomed Pharmacother.* 2019 Feb;110:68-73. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.050.
100. LOURENCO, M. V., CLARKE, J. R., FROZZA, R. L., BOMFIM, T. R., FORNY-GERMANO, L., BATISTA, A. F., et al. (2013). TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab.* 18, 831–843. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.002
101. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
102. MACDONALD, J.A.; WIJEKOON, C.P.; LIAO, K.-C.; MURUVE, D.A. Biochemical and structural aspects of the ATP-binding domain in inflammasome-forming human NLRP proteins. *IUBMB Life* 2013, 65, 851–862. <https://doi.org/10.1002/iub.1210>.
103. MARÍN-TEVA, J. L., CUADROS, M. A., MARTÍN-OLIVA, D., & NAVASCUÉS, J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biology*, 2012, 7, 25–40. 10.1017
104. MECHA, M.; IÑIGO, P.M.; MESTRE, L.; HERNANGÓMEZ, M.; BORRELL, J.; GUAZA, C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protoc. Exch.* 2011. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.218>.
105. MEDRANO-JIMÉNEZ E, MEZA-SOSA KF, URBÁN-ARAGÓN JA, SECUNDINO I, PEDRAZA-ALVA G, PÉREZ-MARTÍNEZ L. Microglial activation in Alzheimer's disease: The role of flavonoids and microRNAs. *J Leukoc Biol.* 2022 Jul;112(1):47-77. doi: 10.1002/JLB.3MR1021-531R.
106. MENDES, C.C.; BAHIA, M.V.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia* 2000, 71, 205–207. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(99\)00145-8](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00145-8).
107. MERAZ-RIOS A. M et al. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers In Integrative Neuroscience.* v.7, p-1-15, 2013.
108. MERCER, L.D.; KELLY, B.L.; HORNE M.K.; BEART, P.M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in

primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical Pharmacology* . v.69, p. 339-345, 2005.

109. MILENKOVIC D, JUDE B, MORAND C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep;64:40-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.046.
110. MORAES, C. A. et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1beta: Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. *Mol Neurobiol*, v. 52, n. 1, p. 653-663, Aug 2015. ISSN 0893-7648.
111. MORI, I.; IIMAI, Y.; KOHSAKA, S.; KIMUR, Y. Upregulated Expression of Iba1 Molecules in the Central Nervous System of Mice in Response to Neurovirulent Influenza A Virus Infection. *Microbiol. Immunol.* 2000, *44*, 729–735.
112. MUHAMMAD, T.; IKRAM, M.; ULLAH, R.; REHMAN, S.U.; KIM, M.O. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling. *Nutrients* 2019, *11*, 648.
113. MURRAY PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2623-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2623.
114. NADKARNI S, JUNG P. Dressed neurons: modeling neural-glia interactions. *Phys Biol*. 2004 Jun;1(1-2):35-41. doi: 10.1088/1478-3967/1/1/004.
115. NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther*, v. 154, p. 21-35, Oct 2015. ISSN 0163-7258.
116. NASCIMENTO RP, DOS SANTOS BL, DA SILVA KC, AMARAL DA SILVA VD, DE FÁTIMA COSTA M, DAVID JM, DAVID JP, MOURA-NETO V, OLIVEIRA MDN, ULRICH H, DE FARIA LOPES GP, COSTA SL. Reverted effect of mesenchymal stem cells in glioblastoma treated with agathisflavone and its selective antitumoral effect on cell viability, migration, and differentiation via STAT3. *J Cell Physiol*. 2021 Jul;236(7):5022-5035. doi: 10.1002/jcp.30209.
117. NAYAK, D. ROTH, T.L. AND MCGAVER, D.B. Microglia Development and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 2014. 32:367–40.
118. NIJIVELDT, R.J.;VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; VAN NORREN, K.; BOELEN, P.G.; CAN LEEUWEN, P.A.; Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 74, p. 418-425, 2001.
119. NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., & HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum*, 11, 95–96, 2005. 10.1126/science.1110647
120. NOBILI A, LATAGLIATA EC, VISCOMI MT, CAVALLUCCI V, CUTULI D, GIACOVAZZO G, KRASHIA P, RIZZO FR, MARINO R, FEDERICI M, DE BARTOLO P, AVERSA D, DELL'ACQUA MC, CORDELLA A, SANCANDI M, KELLER F, PETROSINI L, PUGLISI-ALLEGRA S, MERCURI NB, COCCURELLO R, BERRETTA N, D'AMELIO M. Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2017 Apr 3;8:14727. doi: 10.1038/ncomms14727.
121. OHSAWA, K.; IMAI, Y.; KANAZAWA, H.; SASAKI, Y.; KOHSAKA, S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci*. 2000, *113*, 3073–3084. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>.
122. OHSAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbriin and enhances its actin-bundling activity. *J.*

- Neurochem.* 2004, 88, 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>.
123. OKUN, I.; BALAKIN, K.; TKACHENKO, S.; IVACHTCHENKO, A. Caspase activity modulators as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2008, 8, 322–341. <https://doi.org/10.2174/187152008783961914>.
 124. OLSEN M, AGUILAR X, SEHLIN D, FANG XT, ANTONI G, ERLANDSSON A, SYVÄNEN S. Astroglial Responses to Amyloid-Beta Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Imaging Biol.* 2018 Aug;20(4):605-614. doi: 10.1007/s11307-017-1153-z.
 125. OWENS, T. Toll-Like Receptors in Neurodegeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009, 336, 105–120. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00549-7_6.
 126. PANCHE AN, DIWAN AD, CHANDRA SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016 Dec 29;5:e47. doi: 10.1017/jns.2016.41.
 127. PAOLICELLI, R. C., BOLASCO, G., PAGANI, F., MAGGI, L., SCIANNI, M., PANZANELLI, P., ... GROSS, C. T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333, 1456–1458, 2011. 10.1126/science.1202529
 128. PARCHETA, M.; ŚWISŁOCKA, R.; ORZECHOWSKA, S.; AKIMOWICZ, M.; CHOIŃSKA, R.; LEWANDOWSKI, W. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. *Materials* 2021, 14, 1984. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>.
 129. PARKER LP, TAYLOR DD, KESTERSON J, METZINGER DS, GERCEL-TAYLOR C. Modulation of microRNA associated with ovarian cancer cells by genistein. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2009;30(6):616-21.
 130. PAULSEN BS, SOUZA CS, CHICAYBAM L, BONAMINO MH, BAHIA M, COSTA SL, BORGES HL, REHEN SK. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its receptors α and β in pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Oct;20(10):1711-21. doi: 10.1089/scd.2010.0446.
 131. PENA-PHILIPPIDES JC, CABALLERO-GARRIDO E, LORDKIPANIDZE T, ROITBAK T. In vivo inhibition of miR-155 significantly alters post-stroke inflammatory response. *J Neuroinflammation.* 2016 Nov 9;13(1):287. doi: 10.1186/s12974-016-0753-x.
 132. PENG-FEI H, A-RU-NA, HUI C, HONG-YU W, JIN-SHAN C. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects bovine endometrial tissue against LPS-induced inflammatory injury via JAK2/STAT3 pathway and COX-2 derived prostaglandin E₂. *Eur J Pharmacol.* 2021 Jun 5;900:174067. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174067.
 133. PONOMAREV ED, VEREMEYKO T, WEINER HL. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia* 61: 91-103, 2013.
 134. PORTER, A.; JÄNICKE, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999, 6, 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>.
 135. PROCACCINI C, SANTOPAULO M, FAICCHIA D, COLAMATTEO A, FORMISANO L, DE CANDIA P, GALGANI M, DE ROSA V, MATARESE G. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism.* 2016 Sep;65(9):1376-90. doi: 10.1016/j.metabol.2016.05.018.
 136. RADESÄTER, A. C., JOHANSSON, S., OBERG, C., AND LUTHMAN, J. The vitamin-E analog trolox and the NMDA antagonist MK-801 protect pyramidal neurons in hippocampal slice cultures from IL-1 β -induced neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 2003, 5, 433–442. doi: 10.1007/bf03033173

137. RAZA, S.S.; KHAN, M.M.; AHMAD, A.; ASHAFQAQ, M.; ISLAM, F.; WAGNER, A.P.; SAFHI, M.M. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-kappaB signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience* 2013, 230, 157–171.
138. RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, J.; Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 20, p. 933-956, 1996.
139. ROCK, R. B., GEKKER, G., HU, S., SHENG, W. S., CHEERAN, M., LOKENSGARD, J. R., & PETERSON, P. K. Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 942-964, 2004.
140. SABA R, GUSHUE S, HUZAREWICH RL, MANGUIAT K, MEDINA S, ROBERTSON C, BOOTH SA. MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS One*. 2012; 7(2):e30832. doi: 10.1371/journal.pone.0030832.
141. SABOGAL-GUÁQUETA, A.M.; MUNOZ-MANCO, J.I.; RAMÍREZ-PINEDA, J.R.; LAMPREA-RODRIGUEZ, M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G.P. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* 2015, 93, 134–145.
142. SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
143. SCHOUSBOE A, SCAFIDI S, BAK LK, WAAGEPETERSEN HS, MCKENNA MC. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol*. 2014;11:13-30. doi: 10.1007/978-3-319-08894-5_2
144. SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem*. 2000, 267, 4904–4911.
145. SHEN, R.; DENG, W.; LI, C.; ZENG, G. A natural flavonoid glucoside icariin inhibits Th1 and Th17 cell differentiation and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int. Immunopharmacol*. 2015, 24, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.015>.
146. SIERRA-FONSECA, J.A.; NAJERA, O.; MARTINEZ-JURADO, J.; WALKER, E.M.; VARELA-RAMIREZ, A.; KHAN, A.M.; MIRANDA, M.; LAMANGO, N.S.; ROYCHOWDHURY, S. Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting Gβγ-microtubule interaction. *BMC Neurosci*. 2014, 15, 132. <https://doi.org/10.1186/s12868-014-0132-4>.
147. SILBER J, LIM DA, PETRITSCH C, PERSSON AI, MAUNAKEA AK, YU M, VANDENBERG SR, GINZINGER DG, JAMES CD, COSTELLO JF, BERGERS G, WEISS WA, ALVAREZ-BUYLLA A, HODGSON JG. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008 Jun 24;6:14. doi: 10.1186/1741-7015-6-14.
148. SILVA AR, PINHEIRO AM, SOUZA CS, FREITAS SR, VASCONCELLOS V, FREIRE SM, VELOZO ES, TARDY M, EL-BACHÁ RS, COSTA MF, COSTA SL. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biol Toxicol*. 2008 Jan;24(1):75-86. doi: 10.1007/s10565-007-9017-y.
149. SIMPSON DSA, OLIVER PL. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 13;9(8):743. doi: 10.3390/antiox9080743.

150. SIMS JR, ZIMMER JA, EVANS CD, LU M, ARDAYFIO P, SPARKS J, WESSELS AM, SHCHERBININ S, WANG H, MONKUL NERY ES, COLLINS EC, SOLOMON P, SALLOWAY S, APOSTOLOVA LG, HANSSON O, RITCHIE C, BROOKS DA, MINTUN M, SKOVRONSKY DM; TRAILBLAZER-ALZ 2 Investigators. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2023 Aug 8;330(6):512-527. doi: 10.1001/jama.2023.13239.
151. SIMS, N.R.; NILSSON, M.; MUYDERMAN, H. Mitochondrial Glutathione: A Modulator of Brain Cell Death. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2004, 36, 329–333. <https://doi.org/10.1023/b:jobb.0000041763.63958.e7>.
152. SINGH, D. P.; CHOPRA, K. Flavocoxid, dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, exhibits neuroprotection in rat model of ischaemic stroke. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 120, p. 33-42, May 2014. ISSN 0091-3057.
153. SOFRONIEW MV, VINTERS HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
154. SONG, J.; KANG, S.M.; LEE, W.T.; PARK, K.A.; LEE, K.M.; LEE, J.E. Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. *Exp. Neurobiol.* 2014, 23, 93–103. <https://doi.org/10.5607/en.2014.23.1.93>.
155. SONG, L.; LEE, C.; SCHINDLER, C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J. Lipid Res.* 2011, 52, 1542–1550. <https://doi.org/10.1194/jlr.m015412>.
156. SOUZA, C.S.; GRANGEIRO, M.S.; PEREIRA, E.P.L.; SANTOS, C.C.; SILVA, A.B.; SAMPAIO, G.P.; FIGUEIREDO, D.D.R.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; SILVA, V.D.A.; BUTT, A.M.; COSTA, S.L. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology*, 2018, V.65, 85-97. [Doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001).
157. SPOHR, T.C.L.S.; STIPURSKY, J.; SASAKI, A.C.; BARBOSA, P.R.; MARTINS; V, BENJAMIM, C.F., ROQUE, N.F., COSTA, S.L., GOMES, F.C.A. Effects of the flavonoid casticin from Brazilian Croton betulaster in cerebral cortical progenitors in vitro: Direct and indirect action through astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, v.3. p. 41-530, 2009.
158. SU W, ALOI MS, GARDEN GA. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain Behav Immun.* 2016 Feb;52:1-8. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.003.
159. SUTINEN M. E; et al. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *Journal of Neuroinflammation*. v. 9, p.1-14, 2012.
160. SUZUKI, Y.; SHIRAI, M.; ASADA, K.; YASUI, H.; KARAYAMA, M.; HOZUMI, H.; FURUHASHI, K.; ENOMOTO, N.; FUJISAWA, T.; NAKAMURA, Y.; et al. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci. Rep.* 2018, 8, 13129. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31565-5>.
161. TAGANOV KD, BOLDIN MP, CHANG KJ, BALTIMORE D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481–12486.
162. THION MS, GAREL S. Microglial ontogeny, diversity and neurodevelopmental functions. *Curr Opin Genet Dev.* 2020 Dec;65:186-194. doi: 10.1016/j.gde.2020.06.013.

163. TSE, J.K.Y. Gut Microbiota, Nitric Oxide, and Microglia as Prerequisites for Neurodegenerative Disorders. *ACS Chem. Neurosci.* 2017, 8, 1438–1447. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00176>.
164. VAN HORSSSEN J, VAN SCHAİK P, WITTE M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? *Neurosci Lett.* 2019 Sep 25;710:132931. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.050.
165. VELAGAPUDI, R.; AJILEYE, O.O.; OKORJI, U.; JAIN, P.; ADEROGBA, M.A.; OLAJIDE, O.A. Agathisflavone isolated from *Anacardium occidentale* suppresses SIRT1-mediated neuroinflammation in BV2 microglia and neurotoxicity in APPSwe-transfected SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Res.* 2018, 32, 1957–1966. <https://doi.org/10.1002/ptr.6122>.
166. VERDERIO, C.; MUZIO, L.; TUROLA, E.; BERGAMI, A.; NOVELLINO, L.; RUFFINI, F.; RIGANTI, L.; CORRADINI, I.; FRANCOLINI, M.; GARZETTI, L.; *et al.* Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Ann. Neurol.* 2012, 72, 610–624. <https://doi.org/10.1002/ana.23627>.
167. VERKHRATSKY & BUTT, 2007. *Glial Neurobiology: A Textbook*, Wiley, Chichester, 2007.
168. VERKHRATSKY A, HO MS, ZOREC R, PARPURA V. The Concept of Neuroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175:1-13. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_1.
169. VERKHRATSKY, A. & BUTT, A. *Glial physiology and pathophysiology: a handbook*. 1^o ed. 2013. Wiley-Blackwell.
170. VILHARDT, F. Cells in focus. Microglia: phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.37, p. 17–21, 2005.
171. WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1740-925x.
172. WANG H, LI Z, GAO J, LIAO Q. Circular RNA circPTK2 regulates oxygen-glucose deprivation-activated microglia-induced hippocampal neuronal apoptosis via miR-29b-SOCS-1-JAK2/STAT3-IL-1 β signaling. *Int J Biol Macromol.* 2019 May 15;129:488-496. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.041. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30742923.)
173. WANG, S.; JING, H.; YANG, H.; LIU, Z.; GUO, H.; CHAI, L.; HU, L. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 164, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.042>.
174. WANG, S.-W.; WANG, Y.-J.; SU, Y.-J.; ZHOU, W.-W.; YANG, S.-G.; ZHANG, R.; ZHAO, M.; LI, Y.-N.; ZHANG, Z.-P.; ZHAN, D.-W.; *et al.* Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology* 2012, 33, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.003>.
175. WAŚIK A, ANTKIEWICZ-MICHALUK L. The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. *Pharmacol Rep.* 2017 Oct;69(5):851-860. doi: 10.1016/j.pharep.2017.03.018.
176. WEI, Y., LI, X. Different phenotypes of microglia in animal models of Alzheimer disease. *Immun Ageing* 19, 44 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00300-0>

177. WEISMAN GA, AJIT D, GARRAD R, PETERSON TS, WOODS LT, THEBEAU C, CAMDEN JM, ERB L. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):559-78. doi: 10.1007/s11302-012-9307-6.
178. WEISMAN GA, AJIT D, GARRAD R, PETERSON TS, WOODS LT, THEBEAU C, CAMDEN JM, ERB L. Neuroprotective roles of the P2Y(2) receptor. *Purinergic Signal*. 2012 Sep;8(3):559-78. doi: 10.1007/s11302-012-9307-6.
179. WEISMAN GA, WANG M, KONG Q, CHORNA NE, NEARY JT, SUN GY, GONZÁLEZ FA, SEYE CI, ERB L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2005;31(1-3):169-83. doi: 10.1385/MN:31:1-3:169.
180. WIDERA EW, BRANGMAN SA, CHIN NA. Ushering in a New Era of Alzheimer Disease Therapy. *JAMA*. 2023 Aug 8;330(6):503-504. doi: 10.1001/jama.2023.11701.
181. WOLF SA, BODDEKE HW, KETTENMANN H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:619-643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406.
182. WU D, WANG C. miR-155 Regulates the Proliferation of Glioma Cells Through PI3K/AKT Signaling. *Front Neurol*. 2020 Apr 28;11:297. doi: 10.3389/fneur.2020.00297;
183. XU, Z.-J.; GU, Y.; WANG, C.-Z.; JIN, Y.; WEN, X.-M.; MA, J.-C.; TANG, L.-J.; MAO, Z.-W.; QIAN, J.; LIN, J. The M2 macrophage marker *CD206*: A novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* 2019, 9, 1683347. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1683347>.
184. YANG Z., ZHONG L., ZHONG S., XIAN R., YUAN B. (2015). MiR-203 protects microglia mediated brain injury by regulating inflammatory responses via feedback to MyD88 in ischemia. *Mol. Immunol.* 65, 293–301.
185. YANG, Y.X.; ZHENG, L.T.; SHI, J.J.; GAO, B.; CHEN, Y.K.; YANG, H.C.; CHEN, H.L.; LI, Y.C.; ZHEN, X.C. Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 1222–1227.
186. YE, Y.; JIN, T.; ZHANG, X.; ZENG, Z.; YE, B.; WANG, J.; ZHONG, Y.; XIONG, X.; GU, L. Meisoindigo Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Regulating Microglia/Macrophage Polarization via TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Front. Cell. Neurosci.* 2019, 16, 553.
187. YIN H., SONG S., PAN X. (2017). Knockdown of miR-155 protects microglia against LPS-induced inflammatory injury via targeting RACK1: a novel research for intracranial infection. *J. Inflamm.* 14:17. 10.1186/s12950-017-0162-7
188. YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavones in vitro. *Phytotherapy reseach*. v.11, p. 446-450, 1997.
189. ZHANG H, MA Q, ZHANG YW, XU H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2012 Jan;120 Suppl 1(Suppl 1):9-21. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07519.
190. ZHANG Z, WANG J, LI J, WANG X, SONG W. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4. *Biomed Pharmacother.* (2018) 97:511–7.
191. ZHANG Z, YI P, YI M, TONG X, CHENG X, YANG J, HU Y, PENG W. Protective Effect of Quercetin against H₂O₂-Induced Oxidative Damage in PC-12 Cells: Comprehensive Analysis of a lncRNA-Associated ceRNA Network. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Dec 1;2020:6038919. doi: 10.1155/2020/6038919.

192. ZHANG, C.-C.; YIN, X.; CAO, C.-Y.; WEI, J.; ZHANG, Q.; GAO, J.-M. Chemical constituents from *Herichium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 5078–5082. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.016>.
193. ZHANG, F.; LI, F.; CHEN, G. Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. *Neurol. Sci.* 2014, 35, 583–588. <https://doi.org/10.1007/s10072-013-1566-7>.
194. ZHANG, T.; SU, J.; GUO, B.; WANG, K.; LI, X.; LIANG, G. Apigenin protects blood-brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated in-inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Int. Immunopharmacol.* 2015, 28, 79–87.
195. ZHANG, X.; WANG, G.; GURLEY, E.C.; ZHOU, H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS ONE*, 2014, 9, e107072.
196. ZHONG Y, GU L, YE Y, ZHU H, PU B, WANG J, LI Y, QIU S, XIONG X, JIAN Z. JAK2/STAT3 Axis Intermediates Microglia/Macrophage Polarization During Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Neuroscience*. 2022 Aug 1;496:119-128. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.05.016.