



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

VERÔNICA MOREIRA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA GLIAL PELO
FLAVONOIDE AGATISFLAVONA EM MODELO *IN VITRO* DE
TRAUMA CRÂNIO ENCEFÁLICO**

Salvador, BA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

VERÔNICA MOREIRA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA GLIAL PELO
FLAVONOIDE AGATISFLAVONA EM MODELO *IN VITRO* DE
TRAUMA CRÂNIO ENCEFÁLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Lima Costa
Coorientadora: Dra. Cleonice Creusa dos santos

Salvador, BA

2023

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

S725 Sousa, Verônica Moreira de
 Caracterização da modulação da resposta glial pelo flavonoide
 agatisflavona em modelo *in vitro* de trauma crânio encefálico/Verônica
 Moreira de Sousa. – Salvador, 2023.
 50 f.: il.

 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Lima Costa; Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª
 Cleonice Creusa dos Santos.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
 Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

 Inclui referências.

 1. Lesão cerebral traumática. 2. Astroglíose. 3. Agatisflavona. 4. NRLP3.
 I. Costa, Silvia Lima. II. Santos, Cleonice Creusa dos. III. Universidade
 Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.899:547.9

VERÔNICA MOREIRA DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA GLIAL PELO
FLAVONOIDE AGATISFLAVONA EM MODELO *IN VITRO* DE TRAUMA CRÂNIO
ENCEFÁLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM), Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Salvador, 14 de dezembro de 2023.

Profa. Dra. Silvia Lima Costa (Orientadora/UFBA)
(Presidente)

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior
(UNEB)

Prof. Dr. Denis de Melo Soares
(UFBA)

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão a Deus, pois sem o SENHOR JESUS em minha vida, nada seria possível; a Ele atribuo todas as minhas conquistas.

Quero agradecer à minha amada irmã, Iraildes Sousa, que tem sido minha referência de dedicação e excelência em tudo na vida.

A Universidade Federal da Bahia e o Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) obrigada pela infraestrutura que foi essencial na minha formação profissional e no desenvolvimento desta Dissertação e de todos os meus trabalhos já realizados.

Agradeço à CAPES, FAPESB e Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular pelo financiamento de bolsa de mestrado e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

A professora **Dra. Silvia Lima Costa**, minha gratidão é profunda e imensurável. A confiança que depositou em minha capacidade, seu apoio constante e a determinação em nunca desistir de mim foram elementos cruciais na minha trajetória acadêmica. Sua importância tornou-se ainda mais evidente durante a pandemia, quando sua orientação foi como um farol nos momentos mais sombrios. Ela cuidou de mim com um zelo exemplar, sempre me perseverando, apesar das adversidades impostas por um momento tão difícil que foi o isolamento social. Jamais conseguirei encontrar palavras suficientes para expressar minha gratidão pela oportunidade que me foi concedida, bem como por todo o carinho, paciência e respeito que me ofereceu. A professora Silvia não apenas me guiou academicamente, mas também se tornou uma figura inspiradora e um exemplo de dedicação e apoio.

Especialmente quero agradecer à minha co-orientadora, Doutora Cleonice dos Santos. Ela trabalhou incansavelmente comigo na bancada, compartilhando conhecimento e experiência em cada experimento. Independentemente das circunstâncias, ela nunca deixou de acreditar que tudo daria certo. Obrigada Cleo.

Ao Dr. Ramon dos Santos El-Bachá, quero expressar meu apreço por ter me recebido no laboratório.

Aos docentes do LabNq Maria de Fatima Dias Costa, Victor Diógenes, Ravena Nascimento, Juciele Oliveira e Clarissa Schitine, por estarem sempre disponíveis.

Não há dúvidas de que esse feito não seria possível e não teria a mesma qualidade sem as pessoas extraordinárias que cruzaram meu caminho. Agradeço a todos: Balbino, Aurea Almeida, Erica Novaes, Ana Elisa, Rafael Short, Lucas Matheus e Aline Pitta.

Lúcia Fonseca, Felipe Mendes, Monique Reis, Irla Lima, vocês desempenharam papéis importantes em minha jornada, quero expressar minha sincera gratidão. Sem a contribuição de cada um de vocês, nada disso teria sido possível.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a todos os membros do laboratório, sem exceção. Cada um de vocês teve um papel vital em minha conquista. Nenhum sucesso é alcançado sozinho

Obrigada grande equipe

RESUMO

Introdução: A lesão cerebral traumática (LCT) é uma patologia complexa e multifatorial, sendo uma das principais causas de morte e incapacidade em humanos. Imediatamente após a LCT, astrócitos e microglias reagem com alterações morfológicas e funcionais complexas conhecidas como gliose reativa e formam, na área imediatamente adjacente à lesão, a cicatriz glial, é a principal barreira para a regeneração neuronal no sistema nervoso central. O flavonoide agatisflavona (bis-apigenina), presente nas folhas de *Poincianella pyramidalis*, tem demonstrado efeitos neurogênicos, neuroprotetores e anti-inflamatórios, conforme demonstrado em modelos *in vitro* de toxicidade induzida por glutamato, neuroinflamação e desmielinização. O presente estudo investigou o efeito da agatisflavona na integridade neuronal e na modulação da gliose em modelos *ex vivo* de LCT. **Metodologia:** Microdissecações do encéfalo de ratos Wistar (P6-8) foram preparadas e submetidas a lesão mecânica (LM), sendo tratadas ou não diariamente com agatisflavona (5 μ M) por 3 dias. A reatividade dos astrócitos foi investigada pela mensuração de mRNA e expressão da proteína GFAP na área lesionada por imunofluorescência e western blot; a proporção de microglias foi determinada por imunofluorescência para Iba-1; a expressão de mRNA para o inflamassoma NRLP3 e interleucina-1 beta (IL-1 β) foi determinada por RT-qPCR. **Resultados:** Observou-se que a lesão no tecido cortical induziu astrócitos a super expressar GFAP na típica cicatriz glial, e a agatisflavona modulou a expressão desta proteína nos níveis transcricional e pós-transcricional associados à redução da cicatriz. A LM induziu um aumento na proporção de microglias (Iba-1+) que não foi observado em culturas tratadas com agatisflavona. Além disso, o flavonoide modulou negativamente a expressão de mRNA tanto de NRLP3 quanto de IL-1 β , que estavam aumentados na área lesionada do tecido. **Conclusão:** Todas essas descobertas reiteram a propriedade regulatória da resposta inflamatória das células gliais pela agathisflavona, que pode impactar na neuroproteção e deve ser considerada para futuros estudos pré-clínicos e clínicos em patologias do sistema nervoso central, incluindo a LCT. **Palavras-chave:** lesão cerebral traumática, astrogliose, agathisflavona, NRLP3

ABSTRACT

Introduction: Traumatic Brain Injury (TBI) is a complex and multifactorial pathology, being a major cause of death and disability for humans. Immediately after TBI, astrocytes and microglia react with complex morphological and functional changes known as reactive gliosis and forms, in the area immediately adjacent to the lesion, the glial scar, the major barrier to neuronal regeneration in the central nervous system. The flavonoid agathisflavone (bis-apigenin), present in *Poincianella pyramidalis* leaves, has been shown to have neurogenic, neuroprotective, and anti-inflammatory effects, demonstrated *in vitro* models of glutamate-induced toxicity, neuroinflammation, and demyelination. The present study investigated, the effect of agathisflavone in neuronal integrity and in the modulation of gliosis in *ex vivo* models of TBI.

Methodology: Microdissections from the encephalon of Wistar rats (P6-8), were prepared and subjected to mechanical injury (MI) and treated or not daily with agathisflavone (5 μ M) for 3 days. Astrocyte reactivity was investigated by measuring mRNA and expression of GFAP protein in the lesioned area by immunofluorescence and westernblot; proportion of microglia was determined by immunofluorescence for Iba-1; mRNA expression for inflammasome NRPL3 and interleukin -1 beta (IL-1 β) was determined by RT-qPCR. **Results:** It was observed that lesion of the cortical tissue induced astrocytes over expressing GFAP in the typical glial scar formed, and agathisflavone modulated GFAP expression at transcriptional and pos-transcriptional level associated with reduction of glial scar. MI induced increase in the proportion of microglia (Iba-1+) that was not observed in agathisflavone treated cultures. Moreover, the flavonoid modulated negatively both NRLP3 and IL-1 β mRNA expression that was increases in the lesioned area of the tissue. **Conclusion:** All of these findings reiterate the regulatory property of the inflammatory response of glial cells by the flavonoid agathisflavone, which can impact in neuroprotection and should be considered for future pre-clinical and clinical studies for CNS pathologies, including TBI.

Keywords: traumatic brain injury, astrogliosis, microglia, agathisflavone, NRLP3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Contribuições de astrócitos e microglias para os mecanismos de lesão secundária associados à neurodegeneração após lesão cerebral traumática.....	06
Figura 2- <i>Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis</i> e estrutura química de agatisflavona.....	20
Figura 3.: Desenho experimental para cultura organotípica de fatias de cérebro de ratos Wistar.....	29
Figura 4: Análise da reatividade astrocitária e integridade de neurônios em culturas organotípicas de tecido cerebral.....	33
Figura 5- Análise da reatividade microglial e integridade de neurônios em culturas organotípicas de tecido cerebral.....	36
Figura 6- Efeito do flavonoide Agatisflavona na expressão de interleucina -1 β (IL-1 β) em culturas organotípicas de tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica.....	38

LISTA DE TABELAS

Quadro-1: Anticorpos usados na imunofluorescência	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE - Barreira Hematoencefálica
BSA - Albumina Sérica Bovina
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CO₂ - Dióxido de Carbono
DAPI - 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DMSO - Dimetilsulfóxido
EAAT1 - Transportador 1 de Aminoácidos Excitatórios
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLT-1 - Transportador de Glutamato 1
HBSS - Solução Salina Balanceada de Hanks
HEPES - Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-Piperazinaetanossulfônico
IL1- β - Interleucina 1 Beta
IBA1 -molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1
IL6 - Interleucina 6
KCl - Cloreto de Potássio
K_i - Constante Inibitória
LAD - Lesão Axonal Difusa
MEM - Meio Mínimo Essencial
NGF - Fator de Crescimento Nervoso
NOS 2 - Óxido Nítrico Sintase 2
PBS - Tampão de Fosfato Salino
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PFA 4% - Paraformaldeído a 4%
pH - Potencial de Hidrogênio
PVDF - Fluoreto de Polivinilideno
RNA - Ácido Ribonucleico
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SNC - Sistema Nervoso Central
TBS - Tampão Salino Tris

TBS-T - Tampão Salino Tris contendo Tween-20

TCE -Traumatismo Cranioencefálico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alpha

Tris-HCl - Tris(hydroxymethyl)

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Aspectos da fisiopatologia do traumatismo crânio encefálico (TCE)	15
2.2	Potencial farmacológico do flavonoide agatisflavona.....	19
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1.	Considerações Éticas	23
4.2.	Culturas organotípicas	23
4.3.	Flavonoide e Tratamento	24
4.4.	Marcação imunofluorescência	24
4.5.	Análises de expressão de mRNAs por RT-qPCR	27
4.6.	Dosagem de proteínas e Westernblot.....	28
4.7.	Análise estatística dos resultados.....	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1.	O flavonoide agatisflavona modula a reatividade de astrócitos em tecido cerebral submetido a lesão mecânica.....	30
5.2.	O Flavonoide Agatisflavona modula a reatividade de microglia em tecido cerebral submetido a lesão mecânica.....	32
5.3.	O agatisflavona regula negativamente a expressão de mRNA de interleucina1 β e inflamassoma NLRP3 em tecido cerebral submetido a lesão mecânica.....	34
6.	DISCUSSÃO.....	35
7.	CONCLUSÕES.....	37
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) consiste em uma patologia de alta morbimortalidade e invalidez permanente geralmente considerada uma epidemia silenciosa e de grande impacto socioeconômico no mundo (DIAS *et al.*, 2014). Devido à heterogeneidade da patogênese, extensão da lesão e diversidade de respostas celulares aos danos falta estratégias eficazes de tratamento do TCE (BRAUN *et al.*, 2017). Diversos estudos pré-clínicos até o momento, que se concentrou em focar na neuroproteção aguda amplamente caracterizada por medidas histológicas de morte celular e volume da lesão (Lerouet *et al.*, 2021).

Biomoléculas presentes em plantas medicinais têm sido descritas como alternativa no manejo de enfermidades neurodegenerativas (COSTA *et al.*, 2016). Os derivados de plantas são conhecidos há séculos por possuírem uma ampla gama de atividades biológicas. Os flavonoides são hoje considerados ingredientes indispensáveis em diversas aplicações farmacêuticas, médicas e cosméticas (PANCHE *et al.*, 2016). Os flavonoides já foram pontuados por suas ações anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomoduladoras e morfogênicas cientificamente comprovadas que podem ser considerados uma alternativa potencial como agentes terapêuticos para processos oxidativos e inflamatórios do SNC sistema nervoso central (COSTA, *et al.*, 2016), sejam estes associados a doenças neurodegenerativas ou a outros processos que envolvam perda neuronal como no caso TCE (MIRA *et al.*, 2021).

Após uma revisão sobre aspectos da fisiopatologia do trauma, em especial do papel de células gliais na viabilidade e regeneração neuronal, como propriedades neuroprotetoras e antineuroinflamatórias (CHEN *et al.*, 2022), este estudo, traz resultados acerca dos efeitos do biflavonoide agatisflavona em um modelo *ex vivo* de trauma cerebral com foco na modulação da reatividade de astrócitos e microglias, células envolvidas no controle da neuroinflamação, em vista de terapia adjuvante para condições de trauma cerebral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos da fisiopatologia do traumatismo crânio encefálico (TCE)

O TCE caracteriza-se como uma lesão complexa e multifatorial que compromete a função do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) causadas por força externa (como acidente de trânsito, guerra, penetração de objetos, explosão), classificada como TCE primária e lesões secundárias (O'LEARY R & NICHOL, 2018). Os eventos da lesão primária iniciam com o trauma mecânico, cortes axonais, formação de contusões e/ou hemorragias, podendo conduzir à incapacidade em humanos e animais ou a morte (WERNER; ENGELHARD, 2007). As lesões secundárias decorrem da ativação de vias de sinalização celular e dinâmica molecular resultantes em alterações morfológicas e neuroquímicas contribuintes celulares/citotóxicos por excitotoxicidade, sobrecarga de cálcio, disfunção mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo, bem como os mecanismos que influenciam a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE)/edema vasogênico que caracterizam a patologia (JHA et al., 2019; STEIN et al., 2017).

A gravidade do trauma é classificada pela escala de coma de Glasgow determinada por três categorias de lesões leves, moderadas ou graves (BRENNAN et al., 2018) e impacta de modo diferente nos três estágios da neuritogênese: proliferação de células-tronco neurais, neurônios imaturos e neurônios maduros recém-gerados (WANG *et al.*, 2016). Após o TCE ocorre uma perda significativa de neurônios devido à gravidade das lesões (HASSANNEJAD *et al.*, 2018). Em decorrência das lesões cerebrais, os mecanismos adaptativos e reparadores podem contribuir com outras complicações neurológicas, incluindo epilepsia, depressão e demência (FORDINGTON; MANFORD, 2020; WANG et al., 2016).

Os astrócitos, a mais abundante população de células gliais do cérebro humano tem interação com várias células do sistema nervoso central (SNC) e função de regulação neuronal, facilitando a progressão do processo degenerativo em dias e meses do início da lesão, se espalhando para outras regiões distintas da lesão

primária, como tálamo, hipocampo, septo medial, corpo estriado, amígdala (HICKS *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2010). A lesão mecânica primária deforma a rede flexível dos filamentos intermediários dos astrócitos, constituídos principalmente da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e ativa os canais iônicos sensíveis ao impacto físico e os seus receptores, tais como canais iônicos de potencial receptor transitório (TRP), canais sensíveis de potássio e receptores do ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que por sua vez podem induzir a liberação de células neuronais e gliais danificadas ou expressar agudamente os padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) (BRAUN *et al.*, 2017; YUAN & WU, 2022).

As lesões secundárias são favorecidas pela reatividade dos astrócitos e micróglia presentes no tecido cerebral danificado na lesão primária, levando a uma cascata de reações interligadas que induzem o acúmulo excessivo de neurotransmissores e ácido aspártico na fenda sináptica, que por sua vez sinalizam a ativação dos receptores NMDA e AMPA localizados nas membranas pós-sinápticas, e levam à disfunção neuronal persistente ao longo de minutos até meses ou mesmo anos após a lesão primária (NG; LEE., 2019). A ação agonista excessiva dos receptores de NMDA induz aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e sobrecarga de cálcio, levando a morte celular neuronal (KHATRI *et al.*, 2018; KHOSHNAMEH *et al.*, 2017). O aumento da entrada de cálcio influenciará na integridade mitocondrial que acaba gerando um acúmulo de lactato; como consequência ocorrerá o aumento do volume celular que, somado ao aumento da permeabilidade cerebral por ruptura da barreira hematoencefálica cerebral (BHE) pelo trauma, irá resultar em edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e a redução da perfusão no cérebro (ROSENFELD *et al.*, 2012). Por outro lado, canais iônicos sensíveis aos danos físicos uma vez ativos levam ao influxo de sódio e cálcio para os astrócitos induz gradiente de adenosina 5'-trifosfato (ATP), ativando assim outros astrócitos e micróglia liberadoras de DAMP (YUAN; WU, 2022).

A sinalização imunológica por ativação dos receptores de DAMPs, os receptores toll-like (TLR), e receptores purinérgicos de ATP, desempenham importante papel na lesão neurológica progressiva após o TCE (BRAUN *et al.*, 2017;

MCCARTY; LERNER, 2021). A ativação de TLRs por DAMPs nas células microgliais sinalizam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF- α) e liberação quimiocinas (CCL2, CXCL9, CXCL10). CCL2 é o ligante 2 da quimiocina C-C, também chamado de monócito quimiotático proteína-1 (MCP-1), CXCL9 é o ligante 9 da quimiocina C-X-C, também chamado de monócito quimiotático proteína-4 (MIG), CXCL10 é o ligante 10 da quimiocina C-X-C, também chamado de interferon gama-induzido proteína-10 (IP-10) (JACK *et al.*, 2005; WATSON *et al.*, 2020). principalmente via a cascata do inflamossoma. Além disso, microglias também liberam substâncias neurotóxicas, como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (KHATRI *et al.*, 2018). Porém, essas células podem também liberar citocinas anti-inflamatórias (antagonista do receptor TLR IL-1, IL-4, IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF, NGF, TGF- β). BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro, NGF, fator de crescimento nervoso, TGF- β , fator de transformação do crescimento beta que proporcionam a fagocitose de debris celulares e ações neuroprotetoras que podem auxiliar na recuperação do cérebro após a lesão (GUGLIANDOLO *et al.*, 2018; RODNEY *et al.*, 2018).

O aumento na reatividade dos astrócitos em resposta à lesão é denominado astrogliose (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). A astrogliose, devido a alterações morfológicas e sinalização molecular promovem a permeabilidade da BHE e potencializam o processo inflamatório por interação com a micróglia na sinalização inflamatória, via fator nuclear κ -potenciador de cadeia leve de células B ativadas (NF- κ B) (JASSAM *et al.*, 2017). Os astrócitos reativos apresentam aumento na expressão das proteínas de filamento intermediário principalmente GFAP, assim como de vimentina, e aumento de proliferação e secreção de fatores de crescimento, principalmente o fator de crescimento derivado da glia (GDNF), o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF) entre outros (PEKONY & PEKNA 2014). Os astrócitos produzem estes peptídeos neuroprotetores no cérebro lesionado para limpar detritos celulares e orquestrar processos reparadores benéficos para a recuperação neurológica após a TCE (MICHINAGA & KOYAMA, 2019 ; YUAN, & Wu, 2022).

Por outro lado, quando os astrócitos estão desregulados produzem mediadores citotóxicos que dificultam o reparo do SNC por indução de disfunção neuronal e morte celular (KOYAMA; MICHINAGA, 2012; MICHINAGA; KOYAMA, 2021)

Além da ativação microglial, que leva a ativação de inflamassomas, e reatividade de astrócitos, as células imunes do sistema periférico adentram a barreira hematoencefálica (BHE) danificada pelo trauma mecânico potencializando neuroinflamação (NEEDHAM et al., 2019; REHMAN et al, 2019). A inflamação progressiva e a liberação de citocinas podem induzir um processo de lesão cerebral secundária e consequentemente poderá levar a um resultado severo, incluindo a morte (LIU et al., 2010)

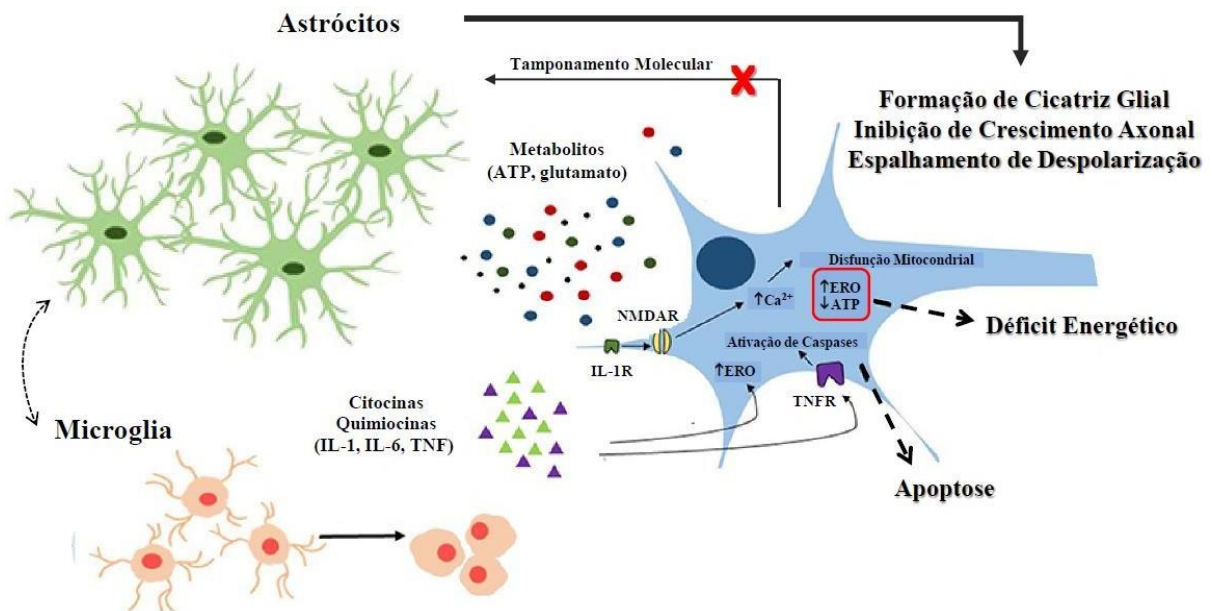
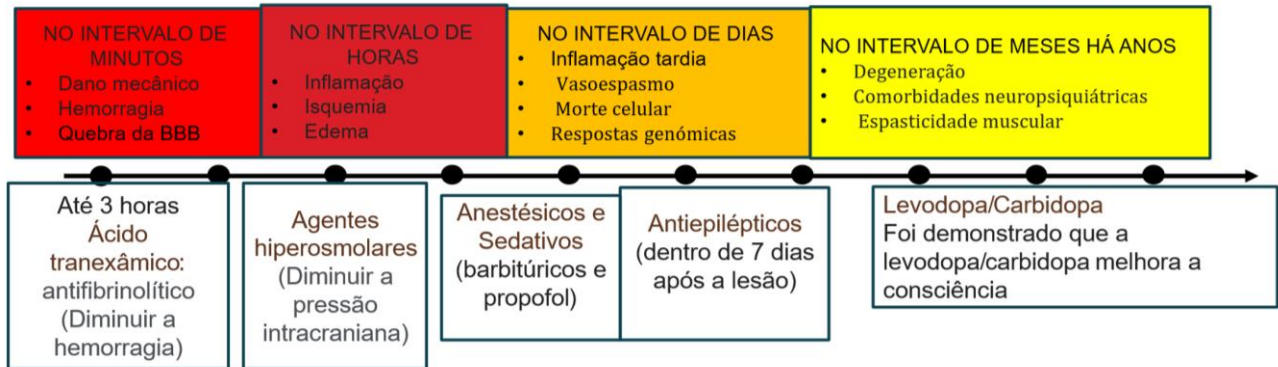


Figura 1 - Contribuições de astrócitos e microglia para os mecanismos de lesão secundária associados à neurodegeneração após lesão cerebral traumática. Fonte: adaptado de SAJJA et al., (2016). Além da ativação microglial que leva a ativação de inflamassomas, e reatividade de astrócitos, as células imunes do sistema periférico adentram a barreira hematoencefálica (BHE) danificada pelo trauma mecânico potencializando a neuroinflamação (NEEDHAM et al., 2019; REHMAN et al, 2019). A inflamação progressiva e a liberação de citocinas podem induzir um processo de lesão cerebral secundária e consequentemente poderá levar a um resultado severo, incluindo a morte (LIU et al., 2010).

2.2 Terapias para o TCE



O tratamento farmacológico visa prevenir ou reduzir os efeitos agudos e crônicos do TCE. O ácido tranexâmico é uma droga que pode diminuir o risco de morte em pacientes com TCE leve a moderado se administrado precocemente. Outros tratamentos para TCE incluem agentes anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antidepressivos, estimulantes e neuromoduladores (TANI et al., 2022).

2.3 Potencial farmacológico do flavonoide agathisflavona

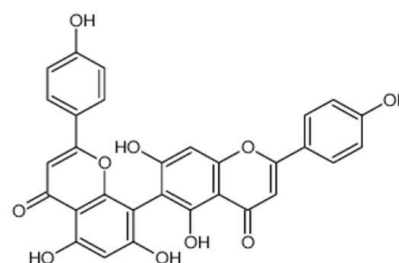
As substâncias naturais são descritas na literatura com o intuito de avaliar o seu potencial e, posteriormente, serem utilizadas para facilitar o manejo de enfermidades neurodegenerativas. Um grupo de substâncias que tem levantado bastante atenção da comunidade científica constitui-se dos compostos polifenólicos conhecidos como flavonoides. A estrutura básica destes metabólitos secundários derivados de plantas consiste em 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, dos quais dois são anéis aromáticos. Diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, dentre outras, e, na última década, pesquisas têm focado em caracterizar propriedades neuroprotetoras e anti-neuroinflamatórias de diversos flavonoides em diferentes modelos de patologias do SNC, o que lhe confere significativa importância farmacológica (dos SANTOS *et. al.*, 2018).

A agathisflavona (bis-apigenina) consiste em um produto do acoplamento

oxidativo de duas apigeninas (4',5,7-triidroxiavone) (BAHIA *et al.*, 2005), e tem despertado interesse na pesquisa científica devido ao seu potencial farmacológico (AMORIM *et al.*, 2018). Este flavonoide tem demonstrado efeitos positivos na indução de diferenciação neuronal e neurogênese (PAULSEN *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016) e efeitos *in vitro* promissores para condições patológicas do SNC, entre eles, efeitos neuroprotetores, antineuroinflamatório, além de antitumoral, como demonstrado em estudos mais recentes (SANTOS SOUZA *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2020, NASCIMENTO *et al.*, 2021). Dos Santos *et al.*, (2018) demonstrou em modelo de co-culturas de neurônios com células gliais enriquecidas de astrócitos que agathisflavona protege estas culturas da excitotoxicidade induzida pelo excesso de glutamato, evidenciada pela redução de morte de neurônios (FluoroJade B+ e Caspase 3+), além de modular o perfil de resposta inflamatória, com redução da expressão de mRNA para citocinas pró-inflamatórias como TNF α (Fator de Necrose Tumoral), IL-6 (Interleucina-6), IL-1 β (Interleucina-1 β) e arginase associadas ao aumento na expressão de neurotrofinas NGF, BDNF, GDNF. No estudo desenvolvido por Almeida *et al.*, 2020 também em co-culturas de neurônio e glia observou que o flavonoide agathisflavona protege neurônios contra efeito destrutivo de LPS ou IL1B, efeitos associados à redução do número de microglias ativadas (CD68+), além da redução na expressão de mRNA para citocinas e componentes de resposta pró-inflamatórias como as citocinas TNF e IL-1, e conexas CCL5 e CCL2, assim como o aumento na expressão de mRNA para citocina regulatória como IL-10. Somado a estes resultados, no trabalho de Amorim *et al.* (2020) usando como modelo de trauma culturas mistas do córtex embrionário submetidas a lesão mecânica, foi demonstrado que o tratamento com agathisflavona modulou a astrogliose e por consequência da cicatriz glial, dano característico do TCE e favoreceu a regeneração de neurônios. Neste modelo de trauma o tratamento com o flavonoide agathisflavona (1 μ M) reduziu a expressão de GFAP e espessamento de processos astrocitários observado nas culturas lesionadas, e por consequência reduziu a cicatriz glial, assim como induziu aumento no número de corpos de neurônios e crescimento de neuritos que adentram a área da lesão. Vale ressaltar que agathisflavona também induziu um aumento na expressão de fatores neurotróficos NGF e BDNF (AMORIM *et al.* 2020).

Pelo exposto, este estudo foi desenvolvido com base na hipótese de que o flavonoide Agathisflavona consegue modular a ativação e perfil inflamatório de astrócitos e microglias após lesão mecânica do tecido cerebral de animais neonatos

em sua complexidade e que pode repercutir na proteção e regeneração de neurônios.



Agathisflavona (bis-apigenina)

Figura 2- *Poincianella (Caesalpinia) pyramidalis* e estrutura química de agathisflavona. Imagem da planta (Catingueira) capturada na região da Chapada Diamantina no Estado da Bahia (fonte: Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia), e estrutura química do flavonoide agathisflavona (bis apigenina) (C₃₀H₁₈O₁₀, CID 5281599) umabis-apigenina (fonte : https://www.chemsrc.com/en/cas/28441-98-7_803942.html).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar efeito do flavonoide agatisflavona na modulação da resposta astrocitária e microglial em modelo *ex vivo* de lesão encefálica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em um modelo *ex vivo* de lesão encefálica:

- Estudar o efeito do flavonoide agatisflavona no perfil de ativação dos astrócitos usando marcador GFAP.
- Caracterizar o efeito do flavonoide agatisflavona no perfil de ativação de micróglia.
- Caracterizar efeito do flavonoide agatisflavona na regulação do inflamassoma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Considerações Éticas

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os animais utilizados no estudo foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e sofreram procedimentos segundo protocolo já bem estabelecido no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 673220818, Anexo I). O número de animais usado no estudo foi baseado em estudo prévio (DE AMORIM et al., 2020).

4.2. Culturas organotípicas

Culturas organotípicas de fatias de cérebros de ratos Wistar com idade pós-natal de 6 a 8 dias (P06 e P08) submetidas a lesão mecânica que foram adotadas como modelo de trauma cerebral. As culturas foram preparadas de acordo com método de Stoppini et al., (1991) com modificações. Para tanto os animais foram decapitados e tiveram seus encéfalos expostos e removidos assepticamente e foram colocados em uma placa com meio de dissecação (HBSS) Solução salina equilibrada composto por CaCl_2 anidro, KCl , NaCl , Glicose, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 anidro, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HEPES, fatias coronais de cérebro com espessura de $350\mu\text{m}$ (duas fatias por animal) foram obtidas em condições estéreis com auxílio do aparelho Tissue Chopper McIlwain e transferidas para cada membrana de microporos (Millicell – CM, Millipore, Bedford, MA, USA) acomodada em uma placa de poliestireno de seis poços e cultivadas em meio essencial mínimo (MEM, Invitrogen) suplementado com HEPES, glicose, L-glutamina, vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal equino

(SFE)+HBSS mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 37 °C durante 30 minutos.

4.3. Flavonoide e Tratamento

Após os 30 minutos de estabilização da cultura, foi feita uma lesão mecânica em cada fatia com auxílio de uma agulha de insulina modificada, através de leve pressão. Em seguida, as fatias foram tratadas com o flavonoide Agatisflavona (FAB) que foi extraído das folhas de *Poincianella pyramidalis* Tull. no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFBA conforme descrito por Bahia e colaboradores (2005). O flavonoide frutificado (>95%) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) em soluções de estoque 100 mM que foram armazenadas e protegidas da luz a -4°C. As culturas organotípicas foram submetidas aos tratamentos controle veicular (DMSO, 0,005%) e FAB (5µM) diluído diretamente no meio de cultura e então incubadas na estufa. O meio foi trocado a cada 24h com as mesmas concentrações em ambos os grupos por um período de 3 dias (72h). No terceiro dia foi coletado o sobrenadante e processado as fatias conforme o desenho experimental apresentado na figura 3.

4.4. Marcação imunofluorescência

Com a perspectiva de avaliar as estruturas das células efetoras (astrócitos e micróglia) das culturas organotípicas foram realizadas marcações de imunofluorescência usando anticorpos específicos estruturais de neurônios com o β III-Tubulina (Biolegend, 801202), de reativação astrocitária, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (DAKO, Z0334), e microglial com molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1) (Novus-NBP, 2-75397). As proteínas foram identificadas com anticorpos secundários conjugados a fluorocromos (Alexa-Fluor 488 ou Alexa-Fluor 596).

Para realizar as marcações por Imuno-Histoquímica (IHQ), após os tratamentos, as culturas foram lavadas três vezes com tampão de fosfato salina (PBS), em seguida incubadas em paraformaldeído (PFA 4%) por um período de 1 hora. Decorrido esse tempo o PFA foi retirado e as culturas lavadas três vezes com PBS. Após as lavagens

foram incubadas por 12 h com Triton x-100 0,1% em PBS (PBS-T) a 4 °C e depois foram incubadas por 3 horas em solução de bloqueio (em PBS-Triton X-100 0,1%, BSA 20%). Incubada overnight com solução de anticorpos primários (em PBS-T, soro de cabra 1 %).

Após o tempo decorrido as fatias foram lavadas 3 vezes em PBS-T e em seguida incubadas por 3 horas em solução de anticorpos secundários AlexaFluor-488 (verde) (em PBS-T, 1% de soro de cabra) para e para GFAP e Iba-1. O núcleo das células em todas as fatias foram coradas com (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OP) por 10 minutos. Passando o período de incubação as fatias foram depois lavadas três vezes e montadas com Fluoromount-G Mounting Medium (Invitrogen). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio confocal de análise espectral (Leica TCS-SP8) com uma objetiva de 40x ou com objetiva 20x, uma objetiva de imersão em óleo de 63x usando para fotos mais detalhadas. Todos os experimentos incluíram culturas onde os anticorpos primários não foram adicionados, coloração inespecífica não foi observada em tais controles negativos. Para os anticorpos adotados nesta análise estão descritos na quadro 1.

Quadro-1 Anticorpos usados na imunofluorescência.

Anticorpo	Espécie	Fabricante	Catálogo	Diluição	Aplicação
Anti-IgG de camundongo conjugado-AlexaFluor 488	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A 11008	1:1000	Anticorpo secundário
Anti-IgG de coelho conjugado-AlexaFluor 594	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A 11012	1:1000	Anticorpo secundário
Anti-molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (Iba-1)	Coelho	Novus	NBP 2-75397	1:500	Marcador de microglia
na β -III (β -TubIII)	Camundongo	Biolegend	801202	1:200	Marcador de neurônios
proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	Coelho	Dako	Z0334	1:1000	Marcador de astrócitos

Fonte: Próprio autor

4.5. Análises de expressão de mRNAs por RT-qPCR

O RNA mensageiro das culturas organotípicas de fatias de cérebros de ratos Wistar foram expostas aos diferentes tratamentos, foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O experimento foi realizado em triplicata biológica. A quantificação do RNA foi realizada através do NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até seu uso. Para a reação do cDNA foi utilizado 1,5 µg do RNA e o kit comercial de transcrição reversa High-Capacity cDNA Reverse Transcription, conforme recomendações do fabricante (ThermoFisher Scientific). O cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização. Posteriormente, foi realizada a reação de PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR) no equipamento ABI 7500 FAST (Applied Biosystems) sob condições de ciclo térmico padrão para Taqman pelo fabricante. Foram avaliadas as expressões de mRNAs nas amostras tratadas e em condições controle, utilizando as sondas TaqMan® comerciais: NLRP3 (Rn04244620_m1); IL1β (Rn00580432_m1); GFAP (Mm01253033_m1). Como normalizador foi usado o gene de referência HPRT1 (Rn01527840_m1) (ThermoFisher Scientific). As amostras de cDNA foram diluídas 1:100, adicionado 5 µL de TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 0,5 µL sondas Taqman® específica para cada reação monoplex em um volume final de 10 µL. A expressão dos níveis de mRNAs foi calculada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008) e analisados utilizando o Graphpad Prism v 9.1.1 (2020).

4.6. Dosagem de proteínas e Westernblot

Para realização das análises da expressão de proteínas marcadoras de reatividade de astrócitos após diferentes condições e tratamento as fatias foram incubadas com tampão de extração (ureia 4 mM, SDS 2%, EGTA 2 mM, Tris – HCl 62,5 mM pH 6,8, Triton X-100 0,5%) contendo (1µL/ml). de um coquetel inibidor de proteases (P8340). A concentração de proteínas foi determinada usando o Kit BCA (BIO-RAD) pelo método de Lowry et al. (1951). Em função da proteína analisada 2,5 µg (para GFAP) ou 15 µg transportador de glutamato tipo 1 (para GLT1) de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes a 10% (SDS- PAGE) e transferidas para membranas de PVDF semi-seco (Bio-Rad).

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em solução salina tamponada com tris contendo 0,05% de Tween-20 (TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários para detecção das proteínas GFAP (1:1.000, DAKO Z0334) ou α -tubulina (1:1.000, Santa Cruz SC 23948). As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário anti-coelho ou anti-rato conjugado com peroxidase (1:10.000; Molecular Probes, G21234) diluído em 5% de leite desnatado TBS-T. Após três lavagens com TBS-T e uma lavagem com TBS, as membranas foram incubadas com a solução de substrato quimioluminescente (kit de substrato ECL Plus Bio Rad) por 5 minutos. As bandas imunorreativas foram então analisadas pelo aparelho ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences). Após a detecção da proteína, foram feitas análises semi-quantitativas por densitometria utilizando o software ImageJ em culturas organotípicas de cérebro através do Western Blotting. Foram usados DMSO (0,0005%) como controle e tratamento.

4.7. Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software GraphPad Prism 8 (GraphPad, San Diego, EUA) para Windows, expressos como média e erro padrão da

média ou mediana e percentil no histograma de frequência. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $P \leq 0,05$. Os resultados que apresentaram uma distribuição normal foram representados pela média e foram submetidos a testes de normalidade, como Shapiro-Wilk ou D'Agostino-Pearson. Testes estatísticos paramétricos foram empregados para as comparações entre os grupos de tratamento e os grupos de controle. Resultados que não se distribuíram normalmente e foram representados por medianas foram analisados com testes não paramétricos, como o teste U de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

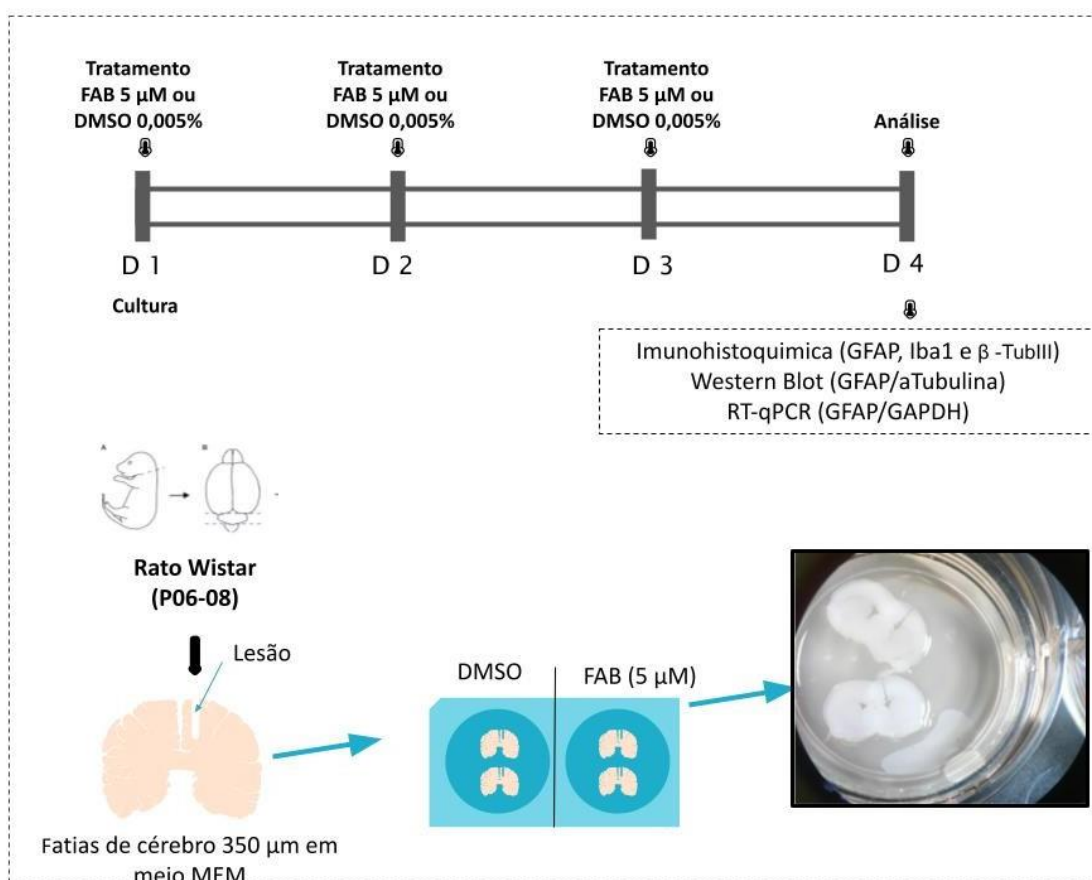


Figura 3.: Desenho experimental para cultura organotípica de fatias de cérebro de ratos Wistar com idade de 6 a 8 dias. Após a obtenção das fatias de cérebro de ratos Wistar, com espessura de 350 µm ($n=4$), foram cultivadas em meio MEM devidamente suplementado. O cultivo ocorreu em estufa, mantida nas condições de 5% de CO_2 e 37°C, utilizando incertes de Millicell em placas de 6 poços. Após 30 minutos de incubação, as fatias foram submetidas a lesão mecânica, seguida pelo tratamento com FAB a 5 µM ou em condições controle (DMSO, 0,005%). Os tratamentos foram aplicados com intervalos de 24 horas, e as análises foram realizadas a partir do 4º dia do experimento. As amostras

foram submetidas a análises estruturais de células efectoras do SNC por imunofluorescência, avaliação da expressão das proteínas de ativação astrocitária por western blot, e RT-qPCR para mensuração da expressão de mRNA de ativação astrocitária.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O flavonoide agatisflavona modula a reatividade de astrócitos em tecido cerebral submetido a lesão mecânica

Visando caracterizar o perfil de reatividade glial e integridade neuronal em fatias de tecido cerebral submetidas a lesão mecânica, tratadas com agatisflavona (5 μ M) ou em condições controle (DMSO, 0,005%), a cada 24 horas por um período total de 3 dias após o início do experimento, seguido pela análise das expressões das proteínas GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e β -tubulina III (componentes do citoesqueleto neuronal). Além disso, os núcleos das células foram corados com DAPI, um agente intercalante da cromatina nuclear.

De acordo com os resultados da imunofluorescência para a expressão de GFAP e β -tubulina III, observou-se que a lesão em fatias de tecido cerebral nas condições controle induziu astrogliose, evidenciada pelo aumento do volume celular e espessura dos processos astrocitários, associados à regulação positiva da expressão de GFAP, especialmente visível nas bordas das lesões, juntamente com a perda de neuritos. Nas culturas das fatias lesionadas e tratadas com agatisflavona, observou-se uma modulação na resposta astrocitária, com regulação negativa da expressão de GFAP nos processos astrocitários que invadiram a área da lesão a partir da borda, apresentando menor espessura. Houve também aumento de corpos de neurônios e crescimento de neuritos que migraram ao longo dos processos astrocitários que penetraram na lesão (Figura 4A). Para validação, a intensidade de fluorescência foi analisada. Foi observada uma redução na intensidade da fluorescência da expressão de GFAP no grupo tratado com agatisflavona em comparação ao grupo controle, conforme demonstrado na Figura 4B.

No intuito de confirmar os dados de imunofluorescência foi analisada a expressão de mRNA para a proteína GFAP por RT-qPCR, e sua expressão por western blot. Observou-se redução significativa na expressão de mRNA de GFAP nas culturas submetidas a lesão mecânica e tratadas com agatisflavona em comparação

com as culturas não tratadas (Figura 4C). A análise da expressão de GFAP por western blot revelou uma redução significativa nos níveis de GFAP na região das lesões nas culturas tratadas com agatisflavona em comparação com a região das lesões das culturas não tratadas (Figura 4D e E). Esses dados indicam uma regulação negativa da expressão de GFAP a nível transcricional e pós-transcricional nas culturas tratadas com agatisflavona após a lesão.

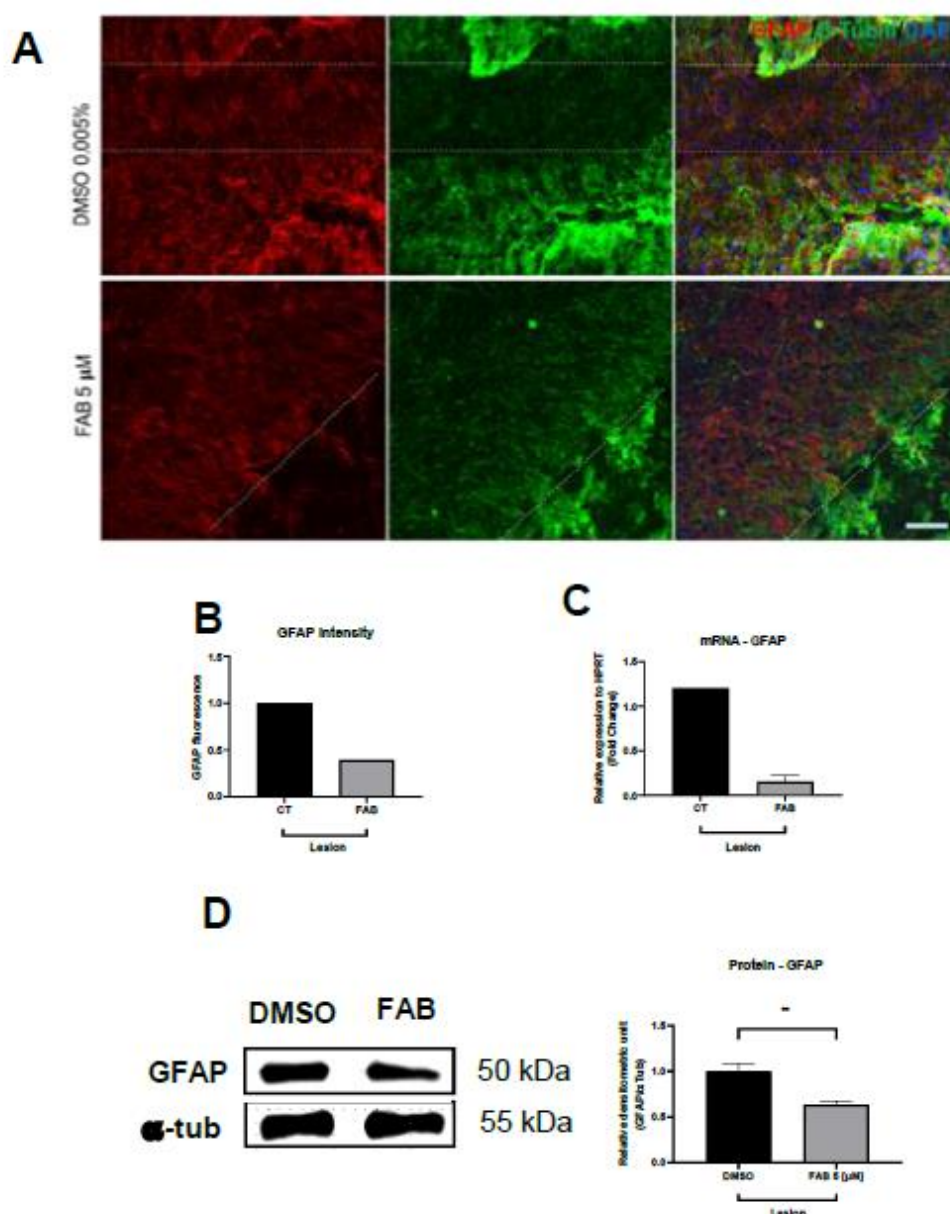


Figura 4: Análise da reatividade astrocitária e integridade de neurônios em culturas organotípicas de tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica tratados ou não com o flavonoide agatisflavona.

As fatias de tecido cerebral foram submetidas a lesão mecânica, tratadas com agatisflavona a 5 μ M (FAB) ou em condições controle (DMSO, 0,005%), com intervalo de 24 horas por um período total de 72 horas após o início do experimento. (A) Fotomicrografias representativas da marcação imunofluorescência para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e β -tubulina III (β -Tub III) na região de fatias de tecido cerebral submetidas a lesão mecânica em condições controle ou tratadas com agatisflavona; barra de escala = 200 μ m; linhas pontilhadas indicam a borda da lesão; (B) O gráfico mostra a quantificação de células Iba1+ expressa como uma porcentagem do número total de controles; (C) Expressão de mRNA de GFAP por RT-qPCR em tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica; (D) Bandas imunorreativas das proteínas GFAP e α -tubulina em tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica. (E) Expressão relativa de GFAP em tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica. Os valores são expressos como a média \pm SEM (n = 3). Os resultados foram normalizados em relação à intensidade da proteína de referência α -tubulina (α -tub). A significância foi determinada usando um teste t não pareado; *** p < 0,002; ** p < 0,0002.

5.2 O Flavonoide Agatisflavona modula a reatividade de microglia em tecido cerebral submetido a lesão mecânica

Conforme demonstrado na Figura 5A, observou-se que a lesão na cultura de fatias de tecido cerebral induziu aumento de número de microglias (células Iba-1+), sugerindo quando comparado com culturas das fatias lesionadas e tratadas com agatisflavona (5 μ M). A redução na proporção de microglias expressando Iba-1 foi também confirmada pelos níveis de fluorescência desta proteína microglial (Figura 5B) nas culturas submetidas à lesão em condições controle em relação àquelas com lesão, mas tratadas com o flavonoide agatisflavona.

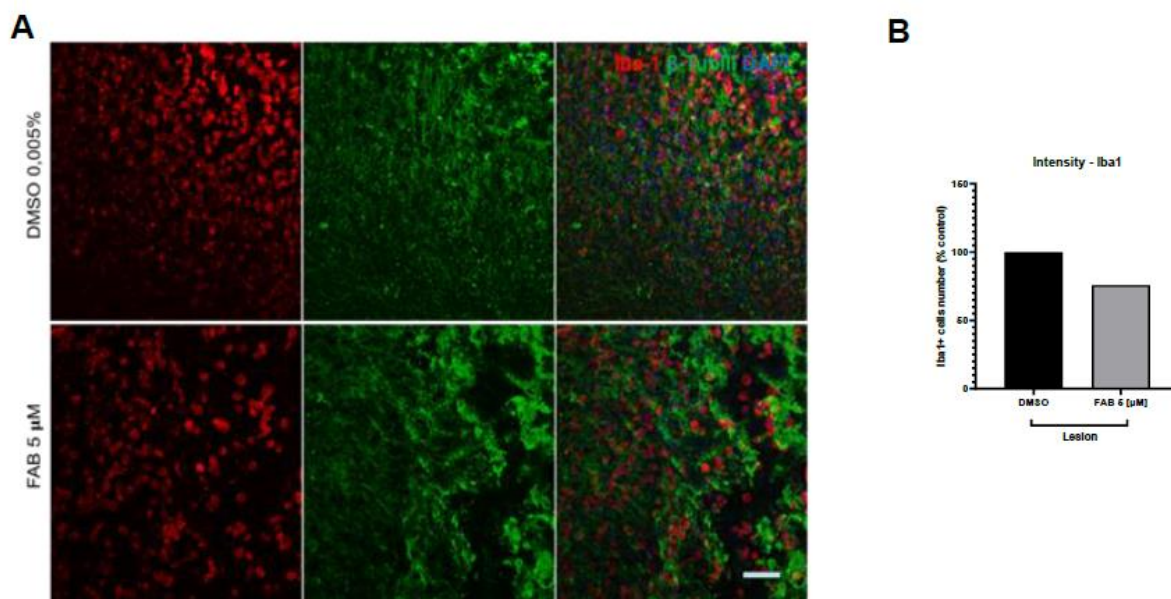


Figura 5- Análise da reatividade microglial e integridade de neurônios em culturas organotípicas de tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica tratados ou não com o flavonoide agatisflavona. As fatias de tecido cerebral foram submetidas a lesão mecânica, tratadas com Agatisflavona a 5 μ M (FAB) ou em condições controle (DMSO, 0,005%), com intervalo de 24 horas por um período total de 72 horas após o início do experimento. (A) Fotomicrografias representativas da marcação imunofluorescência para o marcado de micróglia, proteína ligante de cálcio 1 (Iba-1), e marcador de componentes do citoesqueleto neuronal, β -tubulina III (β -Tub III) na região de fatias de tecido cerebral submetidas a lesão mecânica tratadas com Agatisflavona na concentração de 5 μ M (FAB) ou em condições controle (DMSO; 0,005%); barra de escala = 200 μ m; (B) O gráfico mostra a quantificação de células Iba1+ expressa como uma porcentagem do número total de controles. (C) O gráfico mostra a quantificação de células Iba1 + expressa como uma porcentagem do número total de controles.

5.3 O agatisflavona regula negativamente a expressão de mRNA de interleucina 1 β e inflamassoma NLRP3 em tecido cerebral submetido a lesão mecânica

Para investigar os mecanismos moleculares que poderiam estar envolvidos nos efeitos observados da agatisflavona na modulação da astrogliose e microgliose associada ao aumento de neurônios em fatias de tecido cerebral submetidas a lesão mecânica, examinou-se a expressão de mRNA para as citocinas e neurotrofinas, usando RT-qPCR (figura 6). Estes resultados revelaram que o grupo tratado com agatisflavona regula positivamente a expressão de mRNA de IL-1 β , assim também do mRNA do inflamassoma NLRP3 em comparação ao grupo em condições controle (DMSO 0,005%).

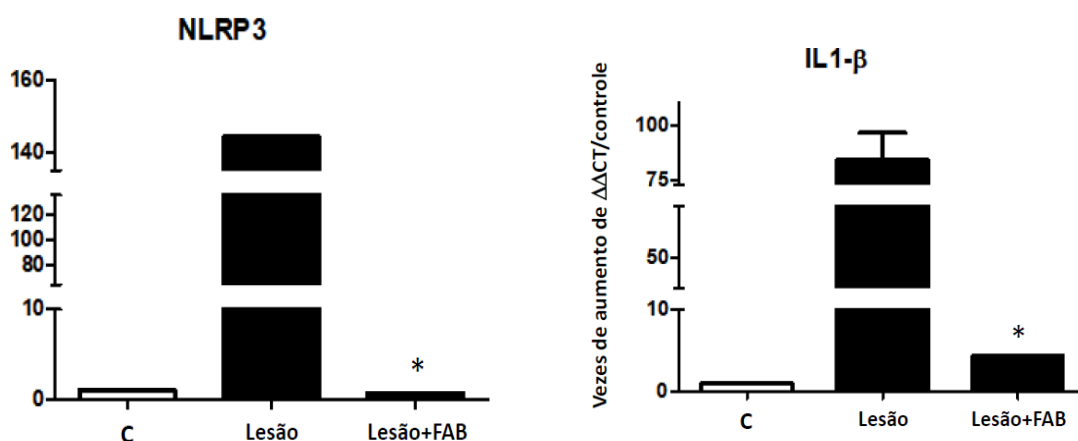


Figura 6- Efeito do flavonoide agatisflavona na expressão de interleucina -1 β (IL-1 β) em culturas organotípicas de tecido cerebral de ratos submetidos à lesão mecânica. As culturas foram lesionadas mecanicamente e mantidas em condições de controle (DMSO 0,005%) ou tratadas diariamente por 3 dias com agatisflavona 5 μ M (FAB). A expressão de mRNA para IL-1 β e para NLRP3 foram analisadas por RT-qPCR; C = controle, região contralateral à lesão; valores expressos em média \pm desvio padrão; diferenças significativas são expressas como (*) $P \leq 0,05$, quando comparadas condições de lesão e lesão com tratamento com o flavonoide (Lesão+FAB). A NOVA unidirecional é seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls de Student.

6. DISCUSSÃO

O TCE consiste em uma patologia de alta morbi- mortalidade e invalidez permanente e de grande impacto socioeconômico no mundo (DIAS *et al.*, 2014). Estudos pré- clínicos têm focado até o momento na neuroproteção ao dano visando reduzir morte celular e volume da lesão (LEROUET *et al.*, 2021). No entanto, em função da heterogeneidade da patogênese do TCE, da extensão da lesão e da diversidade de respostas celulares aos danos, até o momento não existem estratégias terapêuticas eficazes para tratamento (BRAUN *et al.*, 2017). Cultura organotípicas de tecido cerebral constituem uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas terapias para TCE, considerando, entre outros aspectos, a preservação das estruturas cerebrais, a possibilidade de investigar o comportamento de células envolvidas na resposta ao dano físico e ambiente neuroinflamatório. O potencial neuroprotetor e imunomodulatórios do flavonoide agathisflavona já foi caracterizado em diferentes modelos de danos associados a patologias do SNC *in vitro*, como exotoxicidade de neurotransmissor glutamato (DOS SANTOS *et al.*, 2018), dano inflamatório (DE ALMEIDA *et al.*, 2020) e desmielinizante (DE ALMEIDA *et al.*, 2021). Este estudo buscou caracterizar o efeito do flavonoide agathisflavona na modulação da resposta astrocitária e microglial em modelo *ex vivo* de lesão encefálica usando fatias de tecido cerebral submetidas a lesão mecânica.

Entre as células envolvidas na resposta a danos ao tecido cerebral, inclusive danos físicos, os astrócitos tem papel fundamental considerando a capacidade de resposta rápida, com alterações morfológicas, sinalização molecular e produção de fatores de crescimento e inflamatórios na tentativa de conter o dano, fenômeno denominado astrogliose (SOFRONIEW & VINTERS, 2010). No entanto, a ativação excessiva pode levar a processos inflamatórios e agravar os danos aos neurônios. Lesões de graus diferentes são capazes de estimular respostas diferentes, onde uma lesão grave é responsável pela formação de cicatrizes astrocitárias (LIMA *et al.*, 2022). Já está bem estabelecido que a reatividade astrocitária é caracterizada especialmente pelo aumento de volume e processos celulares, associados em especial ao aumento da expressão da proteína dos filamentos intermediários GFAP, que compõem na maioria

a cicatriz glial em torno do dano (BENITZ *et al.*, 1976). Neste estudo, foi observado que a agatisflavona foi capaz de reduzir a expressão de GFAP tanto a nível transcricional como pos-transcricional em fatias organotípicas de córtex após estresse traumático. O estudo de Amorim e col. (2020), desenvolvido em culturas primarias dissociadas de tecido cortical embrionário, também demonstrou que a agatisflavona possui a capacidade de reduzir a astrogliose *in vitro* e aumentar o número de processos de neurônios para a área da lesão, o que foi associado o aumento de fatores neurotróficos como NGF e GDNF.

A astrogliose, devido a alterações morfológicas e sinalização molecular promovem a permeabilidade da BHE e potencializam o processo inflamatório por interação com a micróglia na sinalização inflamatória (JASSAM *et al.*, 2017). A micróglia é capaz de assumir diferentes fenótipos de ativação, pro-inflamatório e anti-inflamatório ou regulatório. Uma das características de micróglia com perfil pró-inflamatório é a rápida proliferação e ativação da via do inflamossoma com produção de IL-1 β (NEEDHAM *et al.*, 2019; REHMAN *et al.*, 2019). Como revisado por (BORTOLOTTI *et al.*, 2018), vários estudos têm demonstrado que os inflamassomas, principalmente NLRP3, NLRP1 e AIM2, estão envolvidos na geração de danos teciduais e disfunção imunológica após trauma. Após o reconhecimento DAMPs induzidos por trauma, os inflamassomas participam de múltiplas maneiras no desenvolvimento de resposta inflamatória exagerada sistêmica e específica, contribuindo para danos aos órgãos, a exemplo do desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo. Os inflamassomas também podem desempenhar um papel na imunossupressão pós- trauma mediada por funções desreguladas dos monócitos comprometendo a defesa do organismo contra agentes infecciosos e aumentando o risco de complicações, como sepse, choque ou falência de múltiplos órgão (LATZ *et al.*, 2013). Neste contexto, caracterizar o envolvimento dos inflamassomas como potenciais alvos terapêuticos é de grande importância. Neste estudo, além da capacidade em regular astrogliose caracterizada pela redução da expressão de GFAP e cicatriz glial, foi observado que o flavonoide modulou a proliferação de microglia nas condições de trauma do tecido cerebral, efeitos associados à modulação da expressão do inflamassoma NLRP3 e IL-1 β . Como já comentado, vários estudos apontam a capacidade imunomoduladora do flavonoide agatisflavona frente a diferentes insultos e, mais recentemente, a propriedade de

modular o inflamassoma NRLP3 em micróglia isoladas frente a dano induzido por LPS foi caracterizado, que repercutiu na proteção de neurônios (DOS SANTOS *et al.*, 2023). Somado a estes estudos, o efeito neuroprotetor da agatisflavona foi demonstrado em modelo *in vivo* de trauma raquimedular (DO NASCIMENTO *et al.*, 2022) destacando o potencial terapêutico do composto para condições de trauma.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho, conclui-se que o flavonoide agatisflavona em modelo *ex vivo* de TCE:

- 1) Apresentou importante efeito na modulação de astrogliose a partir da regulação negativa da expressão de GFAP e;
- 2) Mostrou também efeito antiinflamatório via regulação de proliferação de microglia e expressão do complexo inflamossoma NRLP3 e IL1 β , importantes mediadores da inflamação.

O conjunto destes achados reiteram a propriedade regulatória da resposta inflamatória de células gliais, que impactam em neuroproteção frente a diferentes insultos que deve ser considerada para futuros estudos pré-clínicos e clínicos para patologias do SNC incluindo o TCE.

1. BAHIA, Marcus V., et al. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005, 16: 1402-1405.
2. BENITZ, William E., et al. The protein composition of glial and nerve
3. BORTOLOTTI, Perrine; FAURE, Emmanuel; KIPNIS, Eric. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1900.
4. BRAUN, Molly, et al. White matter damage after traumatic brain injury: a role for damage associated molecular patterns. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863.10: 2614-2626.
5. BRENNAN, Paul M.; MURRAY, Gordon D.; TEASDALE, Graham M. Simplifying the use of prognostic information in traumatic brain injury. Part 1: The GCS-Pupils score: an extended index of clinical severity. *Journal of neurosurgery*, 2018, 128.6: 1612-1620.
6. CHEN, Yu, et al. Beneficial effects of natural flavonoids on neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1006434.
7. COSTA, Silvia Lima, et al. Impact of plant-derived flavonoids on neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity research*, 2016, 30: 41-52.
8. DE ALMEIDA, Monique Marylin Alves, et al. Agathisflavone modifies microglial activation state and myelination in organotypic cerebellar slices culture. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2021, 1-12.
9. DE ALMEIDA, Monique Marylin Alves, et al. Phytoestrogen agathisflavone ameliorates neuroinflammation-induced by LPS and IL-1 β and protects neurons in cocultures of glia/neurons. *Biomolecules*, 2020, 10.4: 562.
10. DE AMORIM, Vanessa Cristina Meira, et al. Agathisflavone modulates astrocytic responses and increases the population of neurons in an in vitro model of traumatic brain injury. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2020, 393: 1921-1930.
11. DIAS, Celeste, et al. Traumatic brain injury in Portugal: trends in hospital admissions from 2000 to 2010. *Acta medica portuguesa*, 2014, 27.3: 349-356.

- 12.DO NASCIMENTO, Ravena P., et al. Agathisflavone as a single therapy or in association with mesenchymal stem cells improves tissue repair in a spinal cord injury model in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 858190.
- 13.DOS SANTOS SOUZA, Cleide, et al. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicology*, 2018, 65: 85-97.
- 14.DOS SANTOS, Balbino Lino, et al. The Flavonoid Agathisflavone Directs Brain Microglia/Macrophages to a Neuroprotective Anti-Inflammatory and Antioxidant State via Regulation of NLRP3 Inflammasome. *Pharmaceutics*, 2023, 15.5: 1410.
- 15.fibers. *FEBS letters*, 1976, 66.2: 285-289.
- 16.FORDINGTON, Surina; MANFORD, Mark. A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury. *Journal of neurology*, 2020, 267: 3105-3111.
- 17.GUGLIANDOLO, Enrico, et al. Neuroprotective effect of artesunate in experimental model of traumatic brain injury. *Frontiers in neurology*, 2018, 9: 590.
- 18.HASSANNEJAD, Zahra, et al. The fate of neurons after traumatic spinal cord injury in rats: A systematic review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2018, 21.6: 546.
- 19.HICKS, Ramona, et al. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta neuropathologica*, 1996, 91: 236-246.
- 20.JACK, Carolyn S., et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *The Journal of Immunology*, 2005, 175.7: 4320-4330.
- 21.JASSAM, Yasir N., et al. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*, 2017, 95.6: 1246-1265.
- 22.JHA, Ruchira M.; KOCHANNEK, Patrick M.; SIMARD, J. Marc. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology*, 2019, 145: 230-246.
- 23.KHATRI, Nidhi, et al. Oxidative stress: major threat in traumatic brain injury. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 2018, 17.9: 689-695.

- 24.KHOSHNAMEH, Seyed Esmail, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurological Sciences*, 2017, 38: 1167-1186.
- 25.LATZ, Eicke; XIAO, T. Sam; STUTZ, Andrea. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13.6: 397-411.
- 26.LEROUET, Dominique; MARCHAND-LEROUX, Catherine; BESSON, Valérie C. Neuropharmacology in traumatic brain injury: from preclinical to clinical neuroprotection?. *Fundamental & clinical pharmacology*, 2021, 35.3: 524-538.
- 27.LIMA, Rui, et al. Pathophysiology and therapeutic approaches for spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23.22: 13833.
- 28.LIU, Ying R., et al. Progressive metabolic and structural cerebral perturbations after traumatic brain injury: an in vivo imaging study in the rat. *Journal of Nuclear Medicine*, 2010, 51.11: 1788-1795.
- 29.LOWRY, Oliver H, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 1951, 193.1: 265-275.
- 30.MCCARTY, Mark F.; LERNER, Aaron. The second phase of brain trauma can be controlled by nutraceuticals that suppress DAMP-mediated microglial activation. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2021, 21.5: 559-570.
- 31.MICHINAGA, Shotaro; KOYAMA, Yutaka. Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.3: 571.
- 32.MICHINAGA, Shotaro; KOYAMA, Yutaka. Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22.12: 6418.
- 33.MIRA, Rodrigo G.; LIRA, Matías; CERPA, Waldo. Traumatic brain injury: mechanisms of glial response. *Frontiers in physiology*, 2021, 12: 740939.
- 34.NEEDHAM, E. J., et al. The immunological response to traumatic brain injury. *Journal of neuroimmunology*, 2019, 332: 112-125.
- 35.NG, Si Yun; LEE, Alan Yiu Wah. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2019, 13: 528.

36. O'LEARY, Ruth A.; NICHOL, Alistair D. Pathophysiology of severe traumatic brain 41
37. PANCHE, Archana N.; DIWAN, Arvind D.; CHANDRA, Sadanandavalli R. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 2016, 5: e47.
38. PAULSEN, Bruna S., et al. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its receptors α and β in pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*, 2011, 20.10: 1711-1721.
39. PEKNY, Milos; PEKNA, Marcela. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews*, 2014, 94.4: 1077-1098.
40. REHMAN, Shafiq Ur, et al. Neurological enhancement effects of melatonin against brain injury-induced oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration via AMPK/CREB signaling. *Cells*, 2019, 8.7: 760. injury. *Journal of neurosurgical sciences*, 2018, 62.5: 542-548.
41. RODNEY, Tamar; OSIER, Nicole; GILL, Jessica. Pro-and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: a review. *Cytokine*, 2018, 110: 248-256.
42. ROSENFELD, Jeffrey V., et al. Early management of severe traumatic brain injury. *The Lancet*, 2012, 380.9847: 1088-1098.
43. SAJJA, Venkata SSS; HLAVAC, Nora; VANDEVORD, Pamela J. Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: biomarkers of glia dysfunction. *Frontiers in integrative neuroscience*, 2016, 10: 7.
44. SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 2010, 119: 7-35.
45. STEIN, Deborah M.; FEATHER, Cristina B.; NAPOLITANO, Lena M. Traumatic brain injury advances. *Critical care clinics*, 2017, 33.1: 1-13.
46. STOPPINI, Luc; BUCHS, P.-A.; MULLER, Dominique. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 1991, 37.2: 173-182.
47. TANI, Jowy, et al. Current and potential pharmacologic therapies for traumatic brain injury. *Pharmaceuticals*, 2022, 15.7: 838.

48. WANG, Jing, et al. Cell-derived exosomes as therapeutic strategies and exosome-derived microRNAs as biomarkers for traumatic brain injury. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11.11: 3223.
49. WANG, Xiaoting, et al. Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *Journal of neurotrauma*, 2016, 33.8: 721-733.
50. WATSON, Adrienne Eve Scovil, et al. Regulation of CNS precursor function by neuronal chemokines. *Neuroscience letters*, 2020, 715: 134533
51. WERNER, Christian; ENGELHARD, Kristin. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia*, 2007, 99.1: 4-9.
52. YUAN, Mengqi; WU, Haitao. Astrocytes in the traumatic brain injury: the good and the bad. *Experimental Neurology*, 2022, 348: 113943.