



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PAPEL DE RECEPTORES DE GLICOCORTICÓIDE NA SINALIZAÇÃO DE AGATHISFLAVONA
EM MODELO *IN VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO**

por

ÁUREA MARIA ALVES NUNES ALMEIDA

TCC apresentado ao Instituto de Biologia
da Universidade Federal Bahia como exigência
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Salvador

30 de julho de 2018

Banca Examinadora

Dra. Suzana Braga de Souza
Professora Associada de Fisiologia
Departamento de Bioregulação
Instituto de Ciências da Saúde, UFBA

Dra. Rejane Conceição Santana
Professora Adjunta de Fisiologia
Departamento de Bioregulação
Instituto de Ciências da Saúde, UFBA

Dra. Suzana Telles da Cunha Lima
Instituto de Biologia, UFBA

RESUMO

A liberação de moléculas pró-inflamatórias e produção de espécies reativas de oxigênio por células gliais são características deletérias de doenças neurodegenerativas. A ocorrência da desregulação crônica das respostas inflamatória e ao estresse em distúrbios neurodegenerativos e psiquiátricos sugere a participação do receptor de glicocorticoide (GR) em mecanismos etiológicos da neurodegeneração. Flavonoides têm ações neuroprotetora, anti-inflamatória, antioxidante, anti-apoptótica e imunomoduladora amplamente reportadas na literatura. O objetivo deste trabalho é avaliar se a ação imunomoduladora e neuroprotetora do biflavonoide agathisflavona (FAB) é mediada por GR. A neuroinflamação de culturas gliais corticais de ratos neonatos foi induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em cultura primária de células gliais. Em seguida, as culturas foram tratadas com FAB na ausência ou na presença de mifepristona (RU486), antagonista de GR e do receptor de progesterona (PR). A resposta das células gliais aos tratamentos foi avaliada de acordo com os parâmetros morfológicos e de expressão proteica através de imunocitoquímica contra proteínas específicas do citoesqueleto de astrócitos (proteína ácida fibrilar glial, GFAP) e microglial (molécula adaptadora ligante de cálcio ionizada, Iba-1). A população celular foi mensurada através de incorporação do reagente fluorescente intercalante de DNA 4-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e da contagem de células Iba-1 positivas. Encontramos diferenças significativas para os tratamentos de FAB na presença ou ausência de RU486 na expressão de GFAP, mas não na morfologia e número populacional de micróglia. As diferenças morfológicas, em microglia, ocorreram em resposta ao tratamento com FAB a 10 µM. As células microgliais submetidas a esse tratamento apresentaram população reduzida e predominância de células com morfologia ramificada. Em conjunto, esses dados sugerem que o efeito de FAB sobre o perfil reativo e pró-inflamatório é mediado, ao menos parcialmente, por GR, e apenas em astrócitos.

Palavras-chave: biflavonoides, glia, neuroproteção.

ABSTRACT

The release of pro-inflammatory molecules and production of reactive oxygen species by glial cells are deleterious characteristics of neurodegenerative diseases. The co-occurrence of chronic inflammation and long-term dysregulation of stress responses in neurodegenerative and psychiatric disorders suggests that the glucocorticoid receptor (GR) participates in aetiological mechanisms of neurodegeneration. Flavonoids have been widely reported for their neuroprotective, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-apoptotic and immunomodulatory properties. The study of their mechanisms of action is promising to the development of preventive or treatment strategies towards neurodegenerative diseases/neuroinflammation and neurodegeneration. The aim of this study is to evaluate if the immunomodulatory action of the biflavonoid agathisflavone (FAB) is mediated by GR. Neuroinflammation was induced by lipopolysaccharide (LPS) treatment on newborn rat cortical glial cells in primary culture. Cells were then treated with FAB in the presence or absence of mifepristone (RU486), a GR and progesterone receptor (PR) antagonist. The response of glial cells to the treatments was evaluated according to the following parameters: i. morphology, ii. microglial proliferation. The following techniques were used to assess glial responses according to the listed parameters: i. MTT assay; ii. Immunocytochemistry. Cell number was quantified by counting Iba-1 positive cells and nuclei stained by 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, a blue, fluorescent stain that intercalates DNA). We found significant differences for GFAP relative expression, but not for microglial morphology, between cells treated with LPS and FAB and cells treated with LPS, FAB and RU486. Significant morphological differences in microglia were observed between 10 μ M FAB treatment and control conditions. Microglia exposed to 10 μ M FAB presented decreased cell number and an increased proportion of moderately ramified cells. In conjunction, these data suggest that the effect of FAB is at least partly mediated by GR and/or PR in astrocytes, but not microglia.

Keywords: molecular pathways, biflavonoids, glia.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, professores, tutores e colegas de trabalho, passados e presentes, que vem me conduzindo na minha formação como pesquisadora.

Aos meus pais, Cassia e Marcus, e aos meus avós, Nailde e Anfilófilo (*in memoriam*), Luiz e Ana: devo a eles o que tenho e o que conquistei de melhor.

Aos meus grandes amigos, Tandara, André, Maureen, Lily e Ira, pelo companheirismo e pela alegria de tê-los na minha vida.

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1.....	11
Figura 2.....	12
Figura 3.....	15
Figura 4.....	15
Figura 5.....	20
Figura 6.....	22
Figura 7.....	23
Figura 8.....	24
Figura 9.....	26
Figura 10.....	27
Figura 11.....	29
Figura 12.....	30
Figura 13.....	31

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1.....	25
---------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	receptor de andrógenos
BSA	albumina de soro bovino
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIV	dias <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DMF	dimetilformamida
FAB	flavonoide agathisflavona
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GR	receptor de glicocorticoide
HHA	eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
Iba-1	molécula adaptadora da proteína de ligação ao cálcio 1
LPS	lipopolissacarídeo
MR	receptor de mineralocorticoide
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF κ B	fator nuclear <i>kappa</i> B
PBS	tampão fosfato-salino
PFA	paraformaldeído
PR	receptor de progesterona
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SE	soro equino
SFB	soro fetal bovino
ROI	região de interesse
ROS	espécies reativas de oxigênio
RU486	mifepristona

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE DAS FIGURAS.....(i)

ÍNDICE DAS TABELAS.....(ii)

LISTA DE ABREVIATURAS.....(iii)

SUMÁRIO.....(iv)

1. INTRODUÇÃO.....10

1.1. Neuroinflamação e neurodegeneração.....10

1.2. Reatividade glial.....10

1.3. Agathisflavona.....11

1.4. Receptor de glicocorticoide.....13

2. METODOLOGIA.....14

2.1 Cultura primária de astrócitos.....14

2.2 Teste de citotoxicidade por MTT.....16

2.3 Imunocitoquímica.....17

2.4 Processamento de imagens.....17

2.5 Análise estatística.....20

3. RESULTADOS.....21

3.1 Teste de citotoxicidade.....21

3.2. Culturas Iba-1 positivas.....22

3.2.1. Número celular total.....24

3.2.2. Número de células Iba-1 positivas.....26

3.2.3. Índice de transformação.....26

3.3 Culturas GFAP-positivas.....28

3.3.1 Análise densitométrica da marcação contra GFAP.....30

4. DISCUSSÃO.....31

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....32

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neuroinflamação e neurodegeneração

A inflamação é uma resposta de defesa do organismo contra agentes nocivos (e.g. patógenos, toxinas, traumas mecânicos e/ou químicos). Quando devidamente regulados, os eventos moleculares e celulares que caracterizam a inflamação promovem a regeneração de tecidos e remoção dos agentes nocivos. A não-resolução da resposta inflamatória, i.e. devido à permanência ou eliminação incompleta do estímulo inflamatório, resulta em uma resposta inflamatória crônica (LEYVA-LOPEZ, 2015).

A neurodegeneração é a perda progressiva de neurônios causada por processos danosos em escala crônica, como estresse oxidativo, danos mitocondriais e inflamação, que ocorrem naturalmente durante o envelhecimento. Entretanto, fatores ambientais e genéticos podem intensificar esses processos de modo a torna-los patológicos. As doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla (entre outras) são caracterizadas sobretudo por disfunções cognitivas e motoras resultantes da neurodegeneração (SOLANKI et al., 2015).

No sistema nervoso, astrócitos e microglia contribuem para a neuroinflamação através dos estados de reatividade glial. A desregulação desses estados pode levar à permanência de um ambiente inflamatório no sistema nervoso e, dessa forma, progressivamente causar danos (GAO & HONG, 2008).

1.2. Reatividade glial

Células gliais podem assumir características morfológicas, funcionais e moleculares que refletem diferentes estados de reatividade, conjuntamente chamadas de gliose (microgliose e astrogliose, para microglia e astrócitos, respectivamente). Os estados de reatividade podem ocorrer em resposta a diversos sinais, e.g. inflamação, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Sua heterogeneidade reflete a flexibilidade de resposta das células gliais a diferentes estímulos (SOFRONIEW, 2009; HANISCH, 2012). A inflamação, assim como outros estímulos característicos de danos ao sistema nervoso central (e.g. dano e/ou morte celular gerada por lesões ao SNC, toxicidade), em um fenótipo de reatividade glial. Por isso, LPS é utilizado para gerar modelos *in vitro* de inflamação para estudar respostas celulares ao estímulo inflamatório (HANISCH, 2012).

Em estado quiescente, astrócitos obtidos a partir de cultura primária cortical têm morfologia poligonal, com citoplasma relativamente pouco eletrodense. Durante a astrogliose induzida pelo tratamento com LPS, há aumento da expressão de GFAP, que torna o citoplasma dos astrócitos mais denso, compacto e com maior número de prolongamentos em relação aos estados não reativos. Sua morfologia torna-se estrelada em vez de poligonal (SOFRONIEW, 2009) (Figura 1A). Em estado não reativo, a microglia tem um citoplasma mais denso e compacto do que os astrócitos, com inúmeros prolongamentos, finos e ramificados. Durante a microgliose, a microglia torna-se ameboide com prolongamentos escassos ou ausentes, geralmente sem ramificações (VERKHRATSKY & NODA, 2014) (Figura 1B). A caracterização morfológica de células gliais em resposta a diferentes tratamentos é sugestiva, portanto, do estado de reatividade glial. Considerando a indução de inflamação pelo LPS e a ação anti-inflamatória da FAB e outros flavonoides (SOFRONIEW, 2009), mudanças no estado de reatividade glial são também sugestivas de mudanças no perfil inflamatório das células.

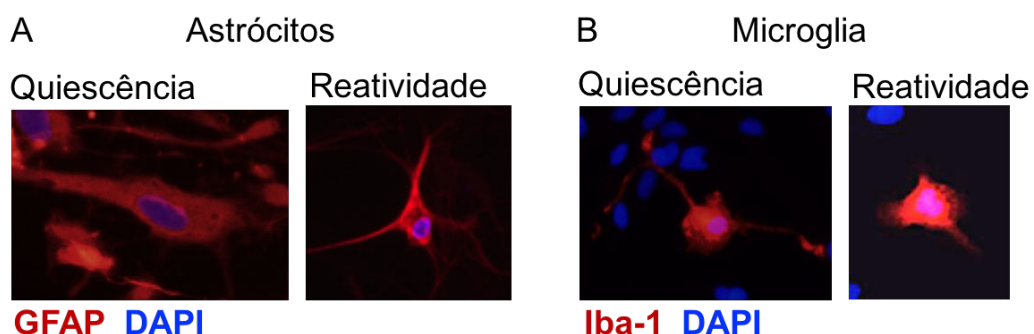


Figura 1. Morfologias representativas dos estados de quiescência e reatividade glial *in vitro*. Astrócitos quiescentes tem morfologia poligonal, com citoplasma pouco denso, enquanto astrócitos reativos tem morfologia estrelada, com numerosos prolongamentos e citoplasma denso devido ao aumento de expressão de GFAP (A). Células microgliais quiescentes tem prolongamentos longos e ramificados. Em estados de reatividade, seu citoplasma tem formato ameboide, com poucos (ou nenhum) prolongamentos, curtos e sem ramificações (B). O citoplasma das células é visualizado através de marcação por imunofluorescência (ver seção 2.3. Imunocitoquímica, em Materiais e Métodos).

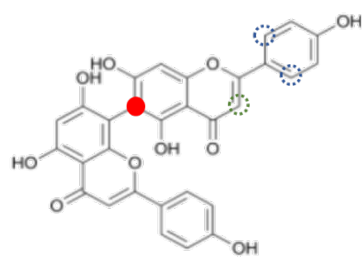
1.3. Agathisflavona

Flavonoides são metabólitos secundários de plantas, incluindo vegetais de consumo humano. Estruturalmente, são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos (A e

B) interligados por um anel heterocíclico (C). O anel C pode ser classificado como pirano ou pirona, com ligação simples e dupla, respectivamente, entre os carbonos 2 e 3. Diferentes grupos de flavonoides se distinguem pelo estado de oxidação (i.e. pela presença de uma ligação dupla ou simples) e pelos radicais ligados aos carbonos 2 e 3 (anel C). Compostos em cada categoria se distinguem pelo número e distribuição de hidroxilas ligadas aos anéis A e B (MIDDLETON et al., 2000; RAUTER et al., 2013).

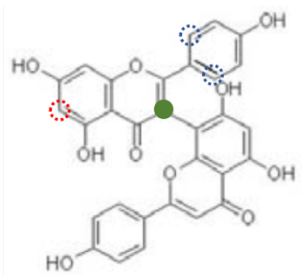
O flavonoide agathisflavona (FAB) é um biflavonoide formado por duas moléculas de apigenina. (COSTA et al., 2016). Flavonoides reduzem a atividade de enzimas do metabolismo energético (OLAJIDE et al., 2017), contribuindo para a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são agentes pró-inflamatórios. A redução na produção de ROS pode ser um dos mecanismos de ação anti-inflamatória dos flavonoides, dado que ROS estimula a atividade de NFκB, fator transcricional que promove a síntese de proteínas que desencadeiam a resposta pró-inflamatória (LEYVA-LOPEZ et al., 2016).

FAB pode ter diferentes conformações (e, portanto, diferentes ações farmacológicas em potencial) a depender do ponto de conexão entre ambas, e.g. 2',8''-biapigenina (THAPA et al., 2011) e biapigenina (SILVA et al., 2008) (Figura 2). FAB está sendo estudado pelo nosso grupo (Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, LabNq); em colaboração com outros grupos, temos demonstrado que FAB possui capacidade de aumentar os efeitos do tratamento de ácido retinóico sobre células-tronco (PAULSEN et al., 2011) e de conferir proteção contra níveis nocivos de glutamato (DOS SANTOS SOUZA et al., 2018). FAB apresenta também potencial anti-inflamatório, como já foi demonstrado para outros biflavonoides (KIM et al., 2008; SILVA et al., 2008) e para sua forma monomérica (COSTA et al., 2016) o que a torna um alvo de interesse para o estudo dos mecanismos de neuroinflamação e neuroproteção.



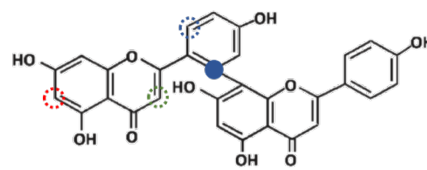
Bis-apigenin (FAB)

COSTA et al., 2016



Biapigenin

SILVA et al., 2008



2',8''-Biapigenin

THAPA et al., 2011

Figura 2. Estruturas químicas do biflavonoide agathisflavona (FAB) formado por um dímero de apigenina: bis-apigenina biapigenina e 2',8''-biapigenina. Os círculos cheios marcam os diferentes carbonos de ligação entre as moléculas de apigenina em cada dímero. Os círculos pontilhados indicam os carbonos alternativos de ligação encontrados nas estruturas dos outros dímeros. A 2',8''-biapigenina tem dois carbonos de ligação que geram a mesma estrutura devido à liberdade de rotação conferida pela ligação simples entre a extremidade fenólica e o restante da molécula.

1.4. Receptor de glicocorticoide

Glicocorticoides (e.g. cortisol, em humanos) são hormônios esteroides com múltiplas funções; uma das principais delas é a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), que constitui a resposta fisiológica ao estresse. Cortisol é liberado pelas glândulas suprarrenais e é o hormônio do eixo HHA que age de forma sistêmica para manter a homeostase em diversos tecidos em resposta ao estresse. Os efeitos do cortisol são mediados pelo receptor de mineralocorticoide (MR) e pelo receptor de glicocorticoide (GR). Um desses efeitos é a retroalimentação negativa da ativação do eixo HHA, através da supressão de hormônios que estimulam a liberação de cortisol pelas glândulas suprarrenais (JUSZCZAK & STANKIEWICZ, 2017). A circulação prolongada e/ou de altos níveis de cortisol gera hiper- ou hipossensibilidade aos efeitos do cortisol – neste último caso, chamada de resistência ao cortisol. Em células do sistema imune, a resistência ao cortisol resulta na ativação imune prolongada, caracterizada pelo excesso de citocinas pró-inflamatórias (COHEN et al., 2012).

RU486 (nome comercial: mifepristona) é um antagonista dos receptores de glicocorticoide (GR) e progesterona (PR) e, mais fracamente, do receptor de andrógenos (AR). Apesar de não ter ação seletiva sobre o GR, RU486 é capaz de inibir a ação anti-inflamatória promovida pelo GR e seus efeitos podem ser revertidos pela dexametasona, glicocorticoide sintético análogo do cortisol (JUSZCZAK & STANKIEWICZ, 2017). Por isso, usamos RU486 e dexametasona neste trabalho para testarmos o envolvimento do GR na ação anti-inflamatória de FAB *in vitro*.

O objetivo deste estudo é avaliar se o receptor de glicocorticoide está envolvido na ação anti-inflamatória de FAB. Para isso utilizamos um modelo *in vitro* de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em cultura de células gliais, na presença ou ausência de antagonista de receptor de glicocorticoide, mifepristona (RU486). Os resultados obtidos

deverão contribuir para a caracterização das vias de sinalização moduladas por FAB em contextos de neuroinflamação e neurodegeneração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura primária de células gliais

A cultura de células gliais composta por 95% de astrócitos e 5% de células microgлияis, aproximadamente, foi obtida a partir de ratos Wistar com até dois dias de idade (dia pós-natal P0 a P2). Os ratos neonatos foram decapitados e seus cérebros removidos. Após a remoção das meninges, ambos os hemisférios corticais foram coletados e dissociados conjuntamente até a formação de uma suspensão celular, que foi centrifugada a 1000 rpm, por 10 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido em meio DMEM não suplementado e inoculado em frasco de poliestireno de 75 cm² (Kasvi, K11-2250). O inóculo foi completado para o volume final de 10 mL por frasco com DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de soro equino (SE) e distribuído em duas de cultura que foram incubadas a 37 °C em estufa umidificada a 5% de CO₂ durante 10 dias. Nesse período, os astrócitos aderem à superfície da garrafa e proliferam, formando uma monocamada de células gliais: microglia e oligodendrócitos crescendo sobre os astrócitos. No 10º dia, as garrafas foram submetidas a agitação por 2 h, a 200 rpm, à temperatura ambiente, para remover as células da microglia e os oligodendrócitos. Após esse procedimento, a proporção aproximada de células em cultura é de 95% de astrócitos e 5% de microglia. O meio foi substituído por DMEM contendo 10% SFB e as garrafas de cultura foram incubadas por mais 5 dias. As células foram removidas dos frascos de cultivo por incubação em tripsina a 0,025%. As células em meio DMEM foram inoculadas em placa de cultivo de 24 poços e submetidas a diferentes tratamentos

por 24 h (Figura 3). A execução das etapas metodológicas está resumida em ordem cronológica na figura 4.

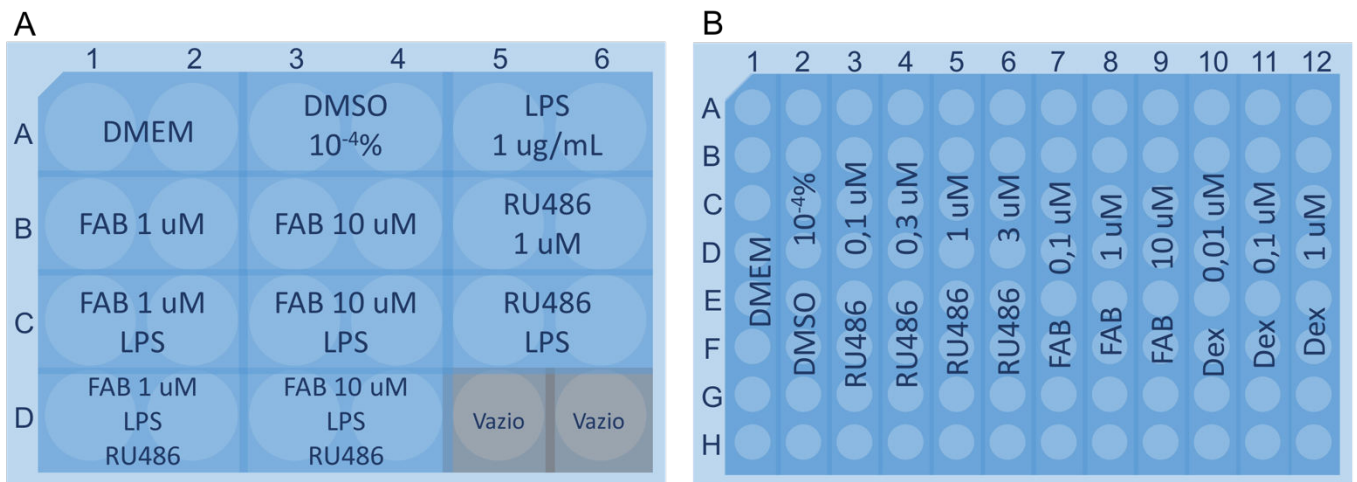


Figura 3. Esquemas das placas com células glias submetidas a diferentes tratamentos experimentais para imunocitoquímica e teste de citotoxicidade por MTT. (A) Desenho experimental da placa de 24 poços para imunocitoquímica. Não foram inoculadas células nos poços D5 e D6. (B) Desenho experimental da placa de 96 poços para teste de citotoxicidade por MTT. Diferentes concentrações de dexametasona foram testadas para uso em estudos posteriores (ver seção 2.2 Teste de citotoxicidade por MTT).

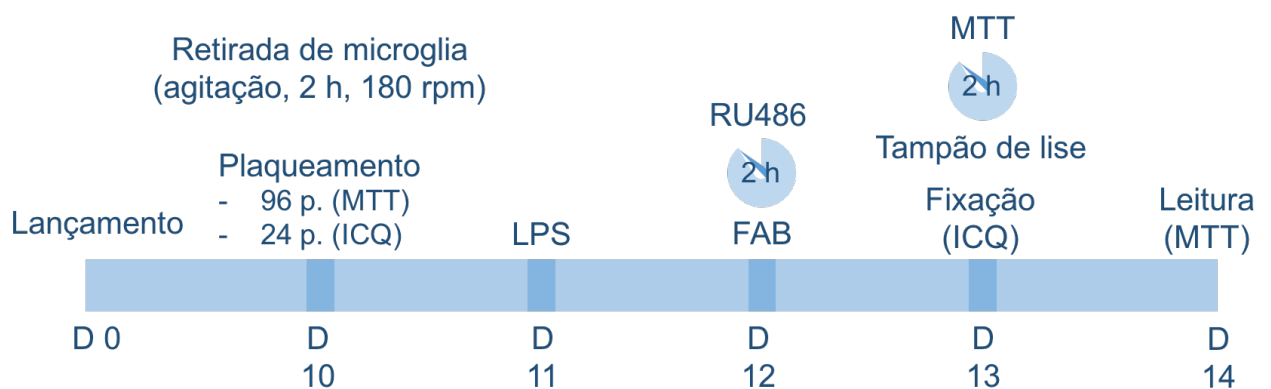


Figura 4. Linha do tempo das técnicas metodológicas. Após o lançamento da cultura em garrafas de 220 mL, as células foram mantidas por 10 dias a 37 °C em estufa com CO₂ a 5%, sem troca de meio. A maioria das células microgлияis e precursores de oligodendrócitos foram removidos por agitação a 180 rpm durante 2 h. Os astrócitos (95% das células em cultura) e células microgлияis (5 %) foram tripsinizados e transferidos para placas de 24 e 96 poços, para imunocitoquímica e teste de citotoxicidade por MTT, respectivamente (plaqueamento). 24 h após o plaqueamento, as células foram submetidas aos tratamentos experimentais. A exposição ao LPS ocorreu por 24 h antes da adição das outras substâncias de cada tratamento (grupos

experimentais não tratados com LPS foram submetidos à exposição a DMEM sem SFB). Após esse período, a exposição às demais drogas ocorreu por 24 h e os demais testes foram realizados.

2.2 Teste de citotoxicidade por MTT

O teste de citotoxicidade por MTT foi conduzido para estabelecermos, dentre as concentrações de RU486, FAB e dexametasona encontradas na literatura, os maiores valores não-citotóxicos para nosso modelo *in vitro*. O teste se baseia na conversão do MTT, sal de tetrazólio, de cor amarelada, em MTT-formazan, de cor roxa, por desidrogenases mitocondriais. Por isso, o teste fornece uma medida relativa da atividade mitocondrial e, portanto, da sobrevivência celular. A conversão de MTT em MTT-formazan é proporcional à absorvância de radiação a 595 nm medida em espectrofotômetro.

As células gliais foram cultivadas em uma placa de 96 poços e incubados por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂, com meio DMEM (não suplementado com soro fetal bovino, SFB) contendo diferentes concentrações de RU486 (0,3 uM; 1 uM e 3 uM) e dexametasona (0,01 uM; 0,1 uM e 1 uM) (Figura 3B). Apesar de não ter sido usada em outros testes neste estudo, a determinação de concentrações citotóxicas de dexametasona será útil em estudos posteriores. Cada tratamento foi feito em sete a oito réplicas (n=7 ou n=8), i.e. poços ou amostras (exceto o controle DMEM). Os tratamentos controle foram: “DMEM”, correspondente a DMEM (sem SFB); e “DMSO”, correspondente a 10⁻⁴% DMSO. DMSO é o diluente utilizado no preparo das soluções estoque de FAB, RU486 e LPS. O maior valor de concentração de DMSO entre as soluções utilizadas dessas drogas foi 10⁻⁴ %, correspondente à diluição de FAB a 10 uM. Após a incubação com as drogas, a cultura foi incubada com o reagente MTT por 2 h, a 37 °C, 5% CO₂, protegida da luz. Em seguida, a cultura foi incubada com tampão de dodecil-sulfato de sódio (SDS) e dimetil formamida (DMF) (para dissolução e distribuição homogênea do MTT-formazan) durante a noite em temperatura ambiente, protegida da luz. A placa foi submetida à leitura em espectrofotômetro para quantificar a absorvância de radiação a 595 nm pelas amostras (Figura 4).

Para avaliar a citotoxicidade a partir das leituras de absorvância, comparamos as leituras de cada tratamento com as leituras do controle, no qual a atividade mitocondrial (e, portanto, sobrevivência celular) foi máxima e não houve citotoxicidade (MOSMANN, 1983). A média ou mediana das leituras de cada tratamento foi expressa como percentual da

mediana das leituras de um dos tratamentos controle (meio DMEM sem soro), correspondente a 100% de sobrevivência celular.

2.3 Imunocitoquímica

Após serem cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) em temperatura ambiente por 20 min. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salino (PBS, do termo em inglês *phosphate-saline buffer*) e permeabilizadas por 15 minutos com solução de Triton X-100 a 0,3% diluído em PBS. As células foram incubadas em solução de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine albumin serum*) a 5% diluída em PBS por 1 h para bloqueio de sítios de afinidade proteica inespecíficos pelos anticorpos primário e secundário, para minimizar fluorescência inespecífica. Em seguida, as células foram incubadas com solução de anticorpo primário contra proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*) ou de anticorpo primário contra molécula adaptadora da proteína de ligação ao cálcio 1 (Iba-1, do inglês *ionized calcium-binder adapter molecule 1*), ambos produzidos em camundongo. Ambas as soluções de anticorpo primário foram preparadas na diluição 1:500 em PBS contendo BSA a 1%. A incubação com solução de anticorpo primário foi realizada por 3 h em temperatura ambiente dentro de câmara escura umidificada. As células foram incubadas em solução de PBS contendo BSA a 1% por 20 min para rebloqueio de sítios de afinidade inespecífica pelo anticorpo secundário, também para minimizar fluorescência inespecífica ou de fundo. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 594 contra imunoglobulina G (IgG) de camundongo produzido em cabra na diluição 1:1000 em PBS contendo BSA a 1%. A incubação foi realizada por 1h em temperatura ambiente dentro de câmara escura umidificada. Após a incubação, as células foram lavadas 1 vez com PBS, e incubadas com um agente intercalante de DNA (DAPI) por 5 min em câmara escura umidificada. As células foram lavadas 1 vez com PBS e montadas em lâminas de vidro com N-propilgalato. Oito imagens foram obtidas em cada tratamento através de microscopia de fluorescência (Olympus AX70).

2.4 Processamento de imagens

A análise morfométrica de microglia foi realizada pelos parâmetros: i. área celular e ii. perímetro, através dos quais calculamos o índice de transformação (TI, de *Transformation Index*). O índice de transformação é dado pela fórmula: $TI = P^2/4\pi A$, que corresponde a uma relação entre perímetro (P) e área celular (A). TI expressa em quantas vezes o perímetro excede a área e oferece, portanto, uma medida de ramificação. Por exemplo TI = 1 seria obtido de uma célula perfeitamente redonda e valores cada vez maiores indicam aquisição e aumento de ramificação (Figura 5) (FUJITA et al., 1996; SZABO & GULYA, 2013). Szabó e Gulya (2013) classificaram a microglia em ameboides (TI < 3), moderadamente ramificadas (3 < TI < 13) e ramificadas (13 < TI < 81) com base na predominância de valores de TI nas populações de microglia do córtex de ratos neonatos com diferentes idades *in vitro* (DIV, de *Days In Vitro*). Culturas com até 10 DIV têm morfologia predominantemente amebóide. Entre 10 e 14 DIV, a população torna-se mais heterogênea, com valores de TI em torno de 13. Entre 14 e 28 DIV, passam a predominar valores de TI acima de 13 e que podem ser tão altos quanto 81 (SZABO & GULYA, 2013).

Os níveis de intensidade de fluorescência de GFAP foram analisados através de análise densitométrica das imagens de imunofluorescência através do *software* ImageJ (versão 1.5, disponível em <https://imagej.nih.gov/>).

Para realizarmos a análise morfométrica, submetemos as imagens de microglia a etapas de pré-processamento para realçarmos a área dos corpos celulares em relação ao fundo. O realce de imagens, neste estudo, teve por objetivo representar os corpos celulares da microglia e otimizar a obtenção de informações estruturais. As imagens dos diversos tratamentos foram processadas igualmente seguindo os mesmos padrões.

O perímetro e a área celular foram obtidos através das seguintes operações:

i. Remoção de iluminação de fundo pelo método *pseudoflat-field*, que permite a remoção de padrões irregulares de iluminação de fundo (BROEKE et al., 2014). No caso da marcação por imunofluorescência, este artefato é causado pela ligação inespecífica do anticorpo secundário à superfície de fundo, minimizada pela adição da etapa de rebloqueio (ver Materiais e Métodos, 2.3 Imunocitoquímica).

ii. Transformação em imagens de 8 bits de duas cores. Esta operação amostra todas as tonalidades presentes na imagem, e atribui uma cor, entre as duas cores amostradas, para cada pixel da imagem. Esta transformação é útil para delimitar objetos com diferenças

relativamente abruptas de intensidade e evitar que regiões mais escuras sejam atribuídas erroneamente a iluminação de fundo.

iii. Detecção de bordas, através de função embutida acessada pelo menu "Process >> Find Edges".

iv. Limiarização da imagem. Esta operação atribui dois valores à imagem, cada um deles representando *background* ou *foreground*. A limiarização permite a separação de regiões de interesse (ROIs, de Regions Of Interest, atribuídas ao *foreground*), e.g. células, núcleos etc, do *background*, de modo que sua estrutura possa ser detectada pelo programa e mensurada.

v. Mensuração das ROIs. Esta operação fornece os valores dos parâmetros analisados e é acessada pelo menu "Analyze >> Analyze Particles...".

As operações i.-v. foram feitas sobre a imagem de células Iba-1 positivas e sobre a imagem de núcleos marcados por DAPI no mesmo campo. Todas essas ROIs foram utilizadas conjuntamente para visualizar e selecionar as regiões marcadas por Iba-1 sobrepostas aos núcleos (Figura 8). Cada região selecionada foi mensurada e os dados resultantes de cada imagem foram submetidos às análises estatísticas.

Para realizarmos a análise densitométrica das células GFAP positivas, as imagens da cultura de células da glia foram submetidas à remoção de iluminação de fundo como descrito anteriormente. Em seguida, foram realizadas as seguintes operações:

i. Representação gráfica dos níveis de intensidade da imagem. Esta operação gera um gráfico, que representa: no eixo X, a extensão longitudinal da imagem em pixels; no eixo Y, as variações de intensidade luminosa.

ii. Transformação do gráfico em imagem binária. Esta operação permite atribuir a área sob o gráfico ao *foreground*, i.e. converte-la em uma ROI e mensurar sua área.

iii. Mensuração da área do gráfico. Esta operação é feita como descrito anteriormente para células Iba-1 positivas, na etapa v. O resultado dessas operações está demonstrado na Figura 12.

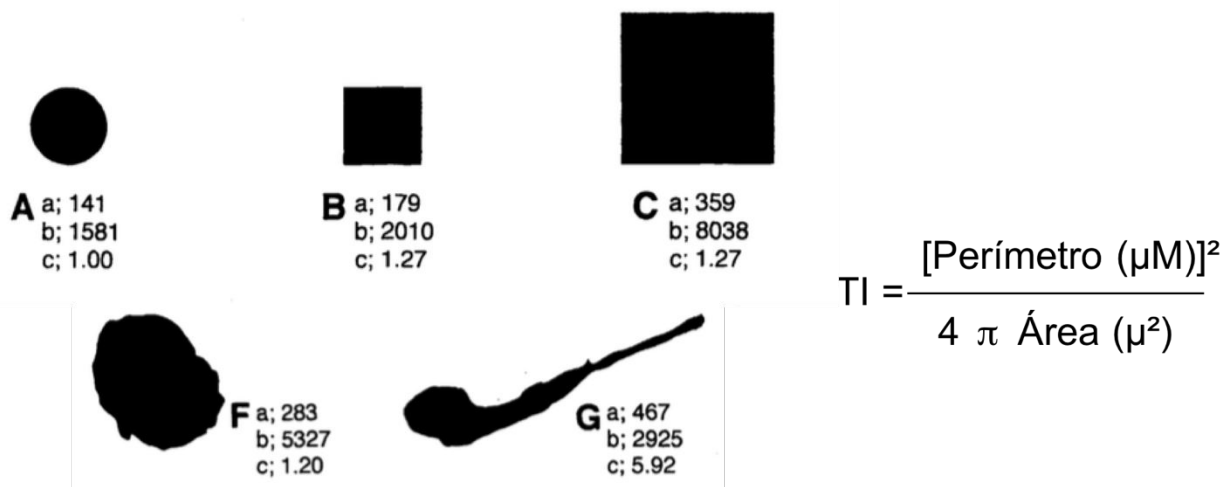


Figura 5. Índice de transformação (TI). TI é um valor que expressa a proporção entre o perímetro (P) e a área (A) e, por isso, permite quantificar a ramificação de células microgliais. Valores maiores de TI indicam maior ramificação (G). Quanto mais o valor de TI se aproximar de 1 (A), menos ramificada e mais ameboide será a célula (F). O valor de TI é independente da área do objeto mensurado (B e C). Imagem adaptada de FUJITA et al., 1996.

2.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram feitos através do *software Graphpad Prism* (versão 7.0d, disponível em <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Para cada parâmetro analisado, os valores de cada um dos grupos foram analisados através da ferramenta “Column Statistics”, que determina se os valores obedecem a uma distribuição normal. A normalidade foi testada através do Teste D’Agostino & Pearson e do Teste Shapiro-Wilk. Testar a normalidade dos valores nos permite escolher entre testes estatísticos paramétricos (para valores em distribuição normal) ou não-paramétricos (distribuição não-normal). Se pelo menos um conjunto de valores tiver distribuição não-normal, devemos usar um teste não-paramétrico.

Os grupos foram comparados aos pares (e.g. DMEM e F 1) através do Teste t de Student (se ambos os grupos tiverem tido valores em distribuição normal) ou do Teste de Mann-Whitney (se pelo menos um dos grupos tiver valores em distribuição não normal). No *Graphpad Prism*, isso é feito através dos seguintes menus, começando na seção “Analysis” da barra de opções na parte superior: “Analyze >> Column Analysis >> t tests (and nonparametric tests)”. Na janela resultante (“Parameters: t tests (and non parametric)”),

selecionamos a opção “Unpaired”, na seção “Experimental Design”. As opções das seções seguintes devem ser selecionadas de acordo com as distribuições dos valores dos grupos comparados (i.e. normal ou não-normal).

3. RESULTADOS

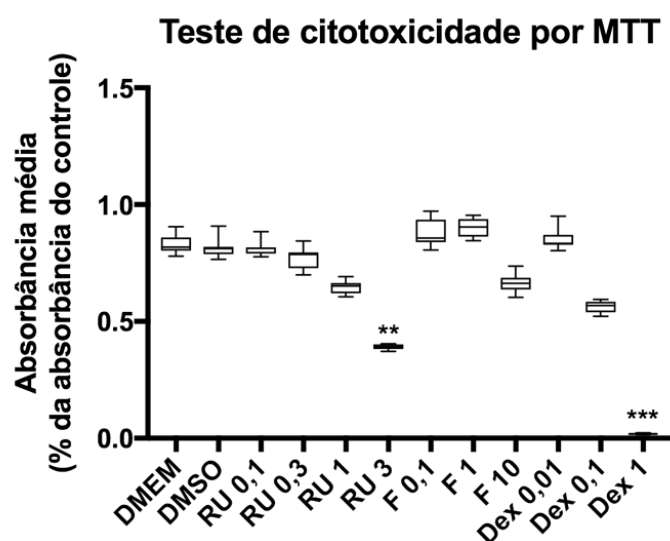
3.1 Teste de citotoxicidade

A absorbância média em resposta a RU486 a 3 uM diferiu significativamente em relação ao controle e também em relação às demais concentrações de RU486 (0,1; 0,3; 1 e 3 uM) e em relação a FAB nas concentrações 0,1 e 1 uM, mas não 10 uM. Estes dados indicam que a maior concentração não citotóxica de RU486 é 1 uM (Figura 6A).

Dentre as concentrações avaliadas neste estudo, a absorbância média em resposta ao tratamento com FAB não apresentou alterações significativas em relação ao controle. Após o tratamento com FAB a 10 uM, a absorbância média foi significativamente mais baixa ($P < 0,001$) em relação à concentração de 0,1 uM, mas não à de 1 uM (Figura 6A). Estes dados indicam que a maior concentração de FAB (10 uM) reduziu a absorbância média em relação ao controle, mas não o suficiente para ser considerada citotóxica.

A absorbância média em resposta ao tratamento com dexametasona a 1 uM diferiu significativamente em relação ao controle e aos demais tratamentos. As absorbâncias médias em resposta à dexametasona a 0,01 uM e a 0,1 uM não foram significativamente menores em relação ao controle. Esses dados indicam que, dentre as concentrações testadas, dexametasona é citotóxica apenas a partir de 1 uM no nosso modelo *in vitro* (Figura 6A).

A



B

Grupo	Abreviação
DMEM	--
DMSO 10 ⁻⁴ %	DMSO
RU486 a 0,1 uM	RU 0,1
RU486 a 0,3 uM	RU 0,3
RU486 a 1 uM	RU 1
RU486 a 3 uM	RU 3
FAB a 0,1 uM	F 0,1
FAB a 1 uM	F 1
FAB a 10 uM	F 10
Dexametasona a 0,01 uM	Dex 0,01
Dexametasona a 0,1 uM	Dex 0,1
Dexametasona a 1 uM	Dex 1

Figura 6. Resultado do teste de citotoxicidade. (A) Médias ou medianas das absorbâncias (eixo y) de cada tratamento (eixo x), expressas em percentual do controle (DMEM não suplementado com soro fetal bovino), considerado como 100%. O asterisco sobre as barras indica diferença estatística em relação ao controle; o número de asteriscos corresponde à significância da diferença estatística, calculada através do teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), de acordo com o valor de P: ****P < 0,000001; ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05. (B) Nomes dos grupos experimentais do teste de citotoxicidade e suas respectivas abreviações, como constam no gráfico.

3.2. Culturas Iba-1 positivas

Astrócitos e microglia foram marcados, separadamente, por imunofluorescência com anticorpos contra GFAP e contra Iba-1, respectivamente. Ambos os anticorpos foram marcados pelo anticorpo secundário com fluoróforo (vermelho) Alexa Fluor 592 e seus núcleos foram contracolorados por DAPI (Figuras 7 e 11). Foram avaliadas características morfológicas microgliais e o perfil de expressão relativa de GFAP de astrócitos. Foram observadas alterações significativas no número celular total (i.e. de núcleos marcados por DAPI) e no número de microglia, sugestivos de proliferação ou morte celular, nos diversos tratamentos. A figura 8 demonstra o resultado do processamento de uma das imagens de células Iba-1 positivas, a partir dos quais foram mensurados área e perímetro de cada região celular manualmente selecionada.

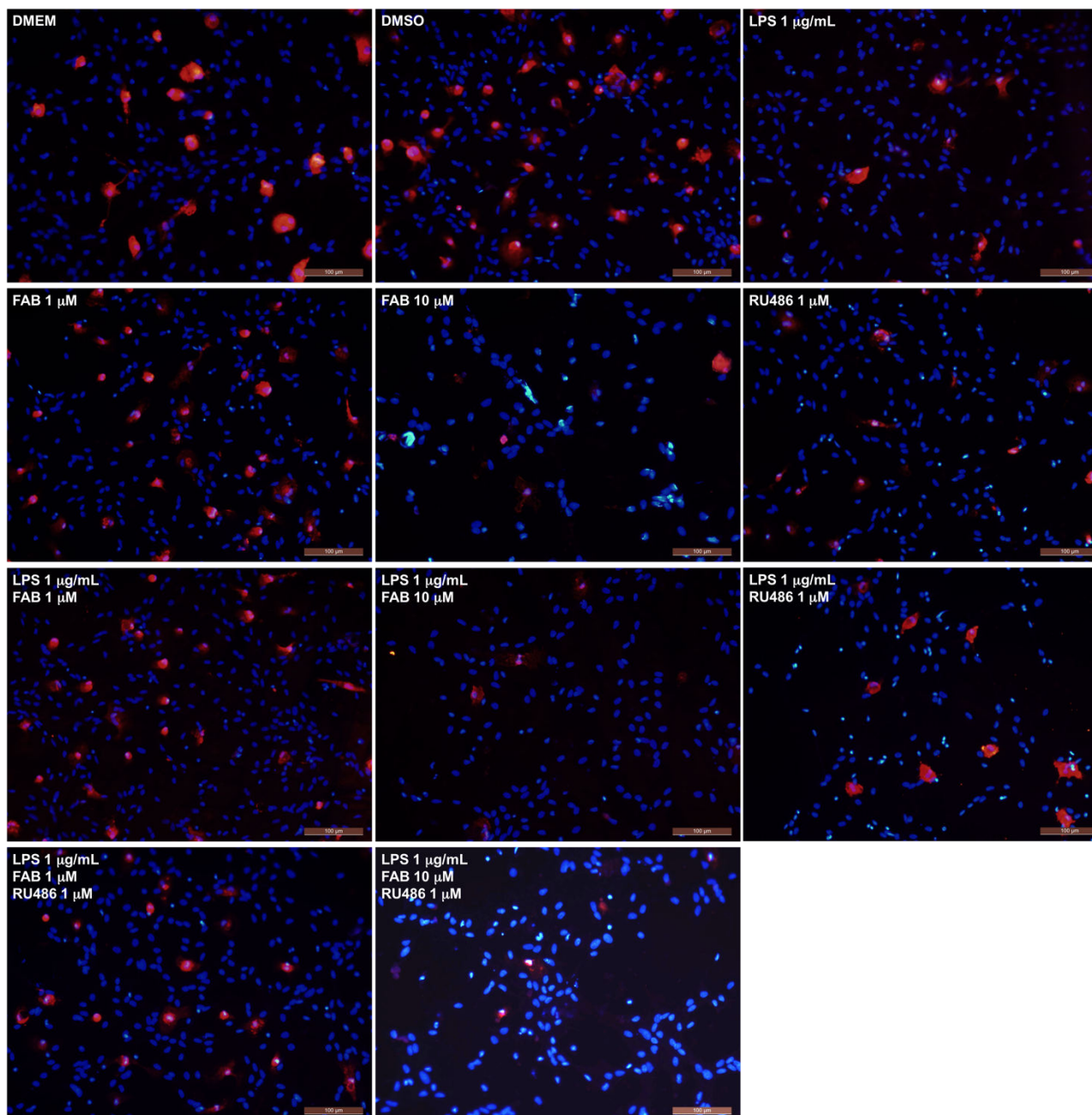


Figura 7. Marcação de células Iba-1 positivas e de núcleos marcados por DAPI através de imunocitoquímica. Cada foto representa o aspecto geral da cultura submetida aos diferentes tratamentos, com células Iba-1 positivas marcadas em vermelho (pelo anticorpo Alexa Fluor 592) e núcleos marcados em azul.

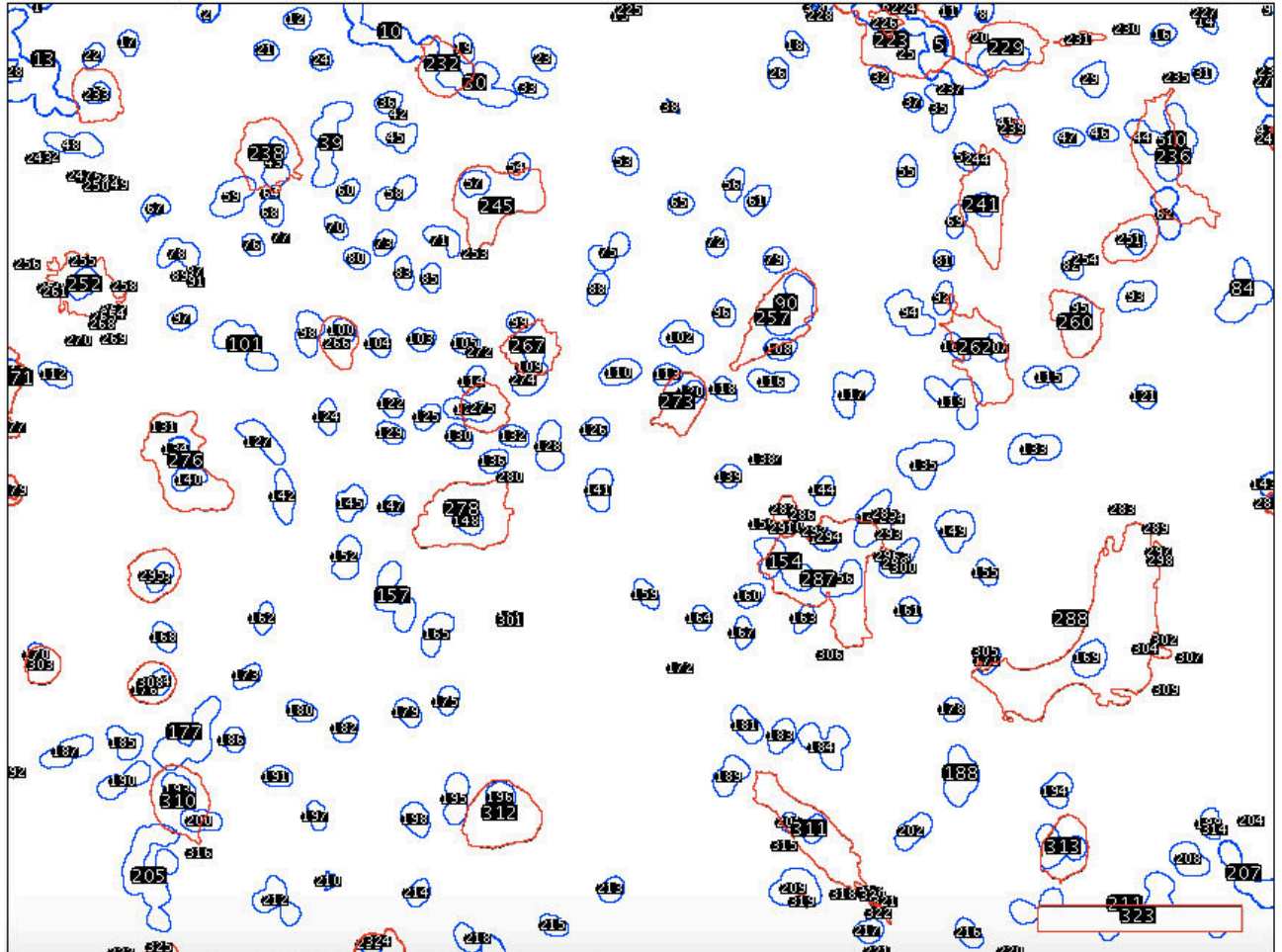


Figura 8. Sobreposição das regiões de interesse (ROIs) obtidas das imagens das marcações contra Iba-1 e DAPI. As estruturas de núcleos e regiões marcadas por Iba-1 foram atribuídas a regiões de *foreground*, que, em seguida, foram identificadas como regiões de interesse (ROIs, identificadas pelos números). Identificamos microglia por ROIs representando estruturas marcadas por Iba-1 (vermelho) totalmente sobrepostas a ROIs representando núcleos individuais ou em agregados (azul). ROIs identificadas como microglia foram selecionadas através dos números e mensuradas.

3.2.1. Número celular total

Os tratamentos FAB 10, L+F10, L+R+F10 apresentaram número de núcleos (i.e. número total de células) significativamente alterado em relação aos controles. Células tratadas com FAB a 1 uM (F 1) ou com LPS a 1 ug/mL e FAB a 1 uM (L+F 1) tiveram aumento significativo no número de núcleos marcados por DAPI, mas não na população microglial. Isso sugere que FAB a 1 uM gerou a proliferação de outras populações de células gliais. Todos os grupos submetidos a tratamentos contendo FAB a 10 uM tiveram redução significativa no número celular em relação aos controles (Figura 9A).

Tabela 1. Nomes dos grupos experimentais da marcação por imunocitoquímica e suas respectivas abreviações, como constam nos gráficos seguintes.

Grupo	Abreviação
DMEM	--
DMSO 10 ⁻⁴ %	DMSO
LPS 1 ug/mL	LPS
FAB 1 uM	FAB 1
FAB 10 uM	FAB 10
RU486 1 uM	RU
LPS 1 ug/mL + FAB 1 uM	L+F 1
LPS 1 ug/mL + FAB 10 uM	L+F 10
LPS 1 ug/mL + RU486 1 uM	L+R
LPS 1 ug/mL + FAB 1 uM + RU486 1 uM	L+R+F 1
LPS 1 ug/mL + FAB 10 uM + RU486 1 uM	L+R+F 10

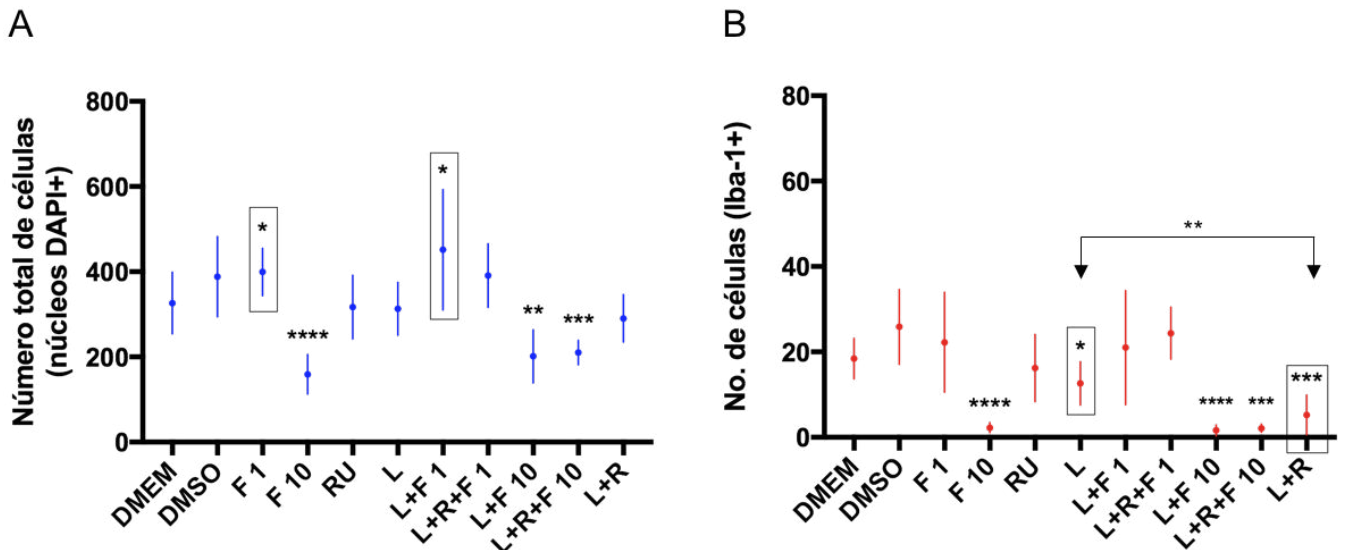


Figura 9. Número celular total (núcleos marcados por DAPI) e de microglia (células Iba-1 positivas) em cada grupo. (A) Média da população total de células em cada um dos tratamentos experimentais. Barras verticais representam o desvio padrão em cada grupo. (B) Média da população microglial em cada um dos tratamentos experimentais. A seta dupla indica diferença estatística significativa entre os grupos apontados (**P < 0,001). Significância estatística calculada de acordo com teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$). Diferenças estabelecidas segundo os valores de P: ****P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05. Estão indicados por retângulos os tratamentos em que houve alterações significativas específicas na população celular total ou na população de microglia.

3.2.2. Número de células Iba-1 positivas

Assim como na análise de número celular total, os tratamentos que incluíram FAB a 10 μ M tiveram diferenças significativas em relação aos controles. Considerando as alterações na população microglial (células Iba-1-positivas), mas não no número total de células (núcleos marcados por DAPI), houve diferença significativa entre os seguintes grupos: LPS a 1 μ g/mL (L) e LPS a 1 μ g/mL e RU486 a 1 μ M (L+R). Esses grupos também diferiram em relação aos grupos controle (Figura 9B). Isso sugere que a população microglial depende, ao menos parcialmente, de GR para manter seu número populacional em um ambiente pró-inflamatório.

3.2.3. Índice de transformação

Considerando os valores absolutos de TI das células microgliais, houve alterações significativas, em relação a um dos grupos controles, para FAB 10 e RU486. Considerando

os grupos de tratamento experimental, houve diferenças significativas apenas entre FAB 10 e todos os outros tratamentos, exceto L+R+F10 (Figura 10A).

Avaliamos se houve alterações, entre os grupos experimentais, em relação às proporções de células classificadas como ameboides ($TI < 3$), moderadamente ramificadas ($3 < TI < 13$) ou ramificadas ($13 < TI < 81$) (SZABO & GULYA, 2013).

Para os valores de $TI < 3$, o único tratamento que gerou uma alteração significativa em relação aos demais foi o de FAB a 10 μ M (F 10) (Figura 10B).

Para os valores de $3 < TI < 13$, o único grupo experimental que diferiu em relação a um dos controles foi FAB 10. Nesse caso, porém, FAB 10 diferiu significativamente apenas em relação a L+F10 e L+R (Figura 10C).

Não houve alterações significativas entre as proporções de células com $13 < TI < 81$ (Figura 10D).

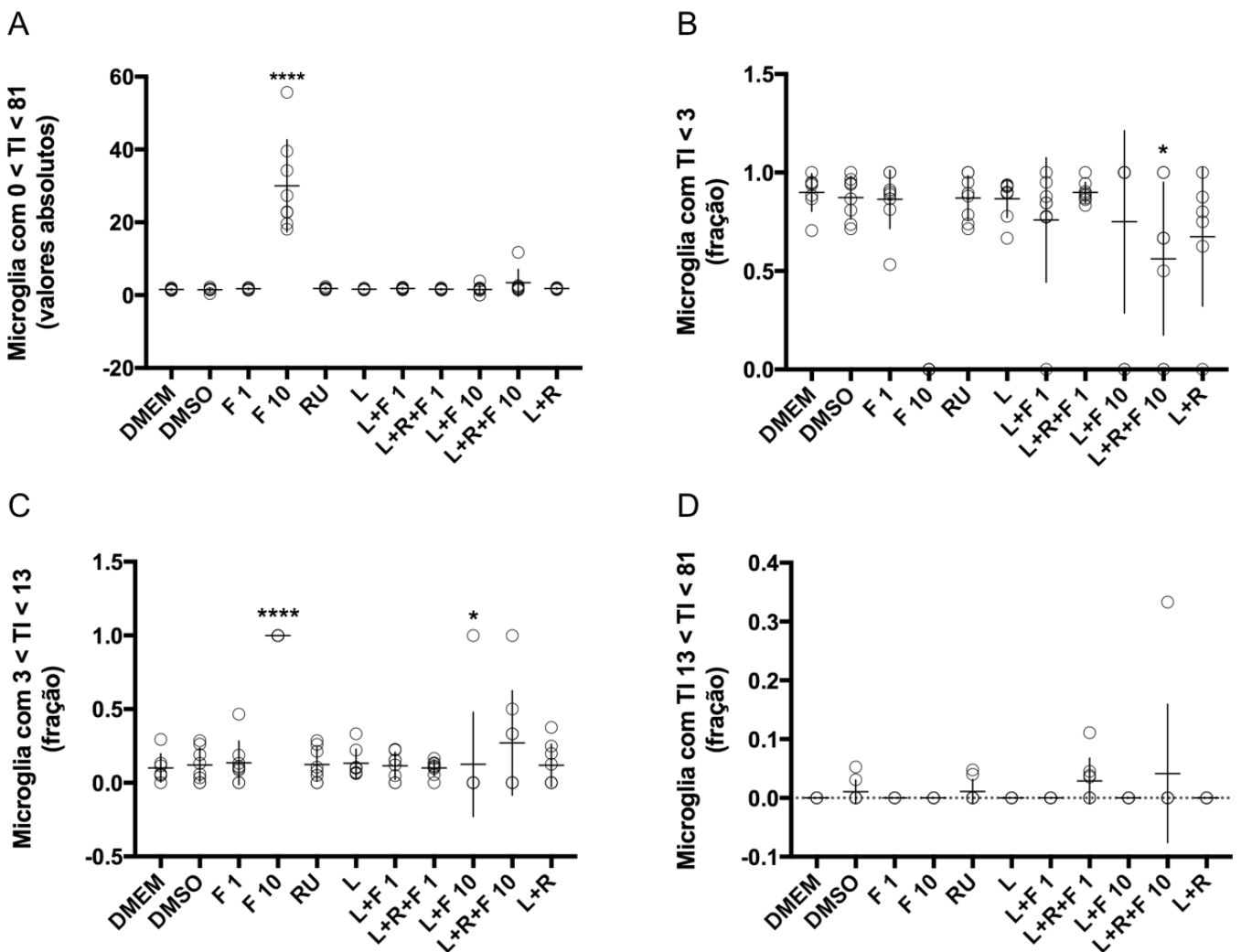


Figura 10. Valores do índice de transformação (TI) das células microgliais. Comparamos os valores absolutos de TI (A) e as proporções de cada grupo de células em cada tratamento (valores dados em fração; B-D). Significância estatística calculada de acordo com teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$). Diferenças estabelecidas segundo os valores de P: ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05. Os asteriscos acima dos colchetes representam valores de significância entre os tratamentos ligados pelos colchetes.

3.3 Culturas GFAP-positivas

A expressão de GFAP é aumentada durante a astrogliose, sendo, portanto, um parâmetro sugestivo de reatividade de astrócitos em imagens obtidas por imunofluorescência (EREIFEJ et al., 2013; LIN & CAI, 2004). Visto que astrócitos formam uma monocamada de células em cultura, de acordo com o protocolo usado neste estudo, não foi possível distinguir células individuais. Isso torna inviável a aplicação de uma análise morfométrica de astrócitos semelhante a que foi feita para microglia neste estudo. A figura 12 demonstra o resultado do processamento de uma das imagens de células GFAP positivas, a partir da qual foi mensurada a área do gráfico representando a distribuição dos valores de intensidade da imagem.

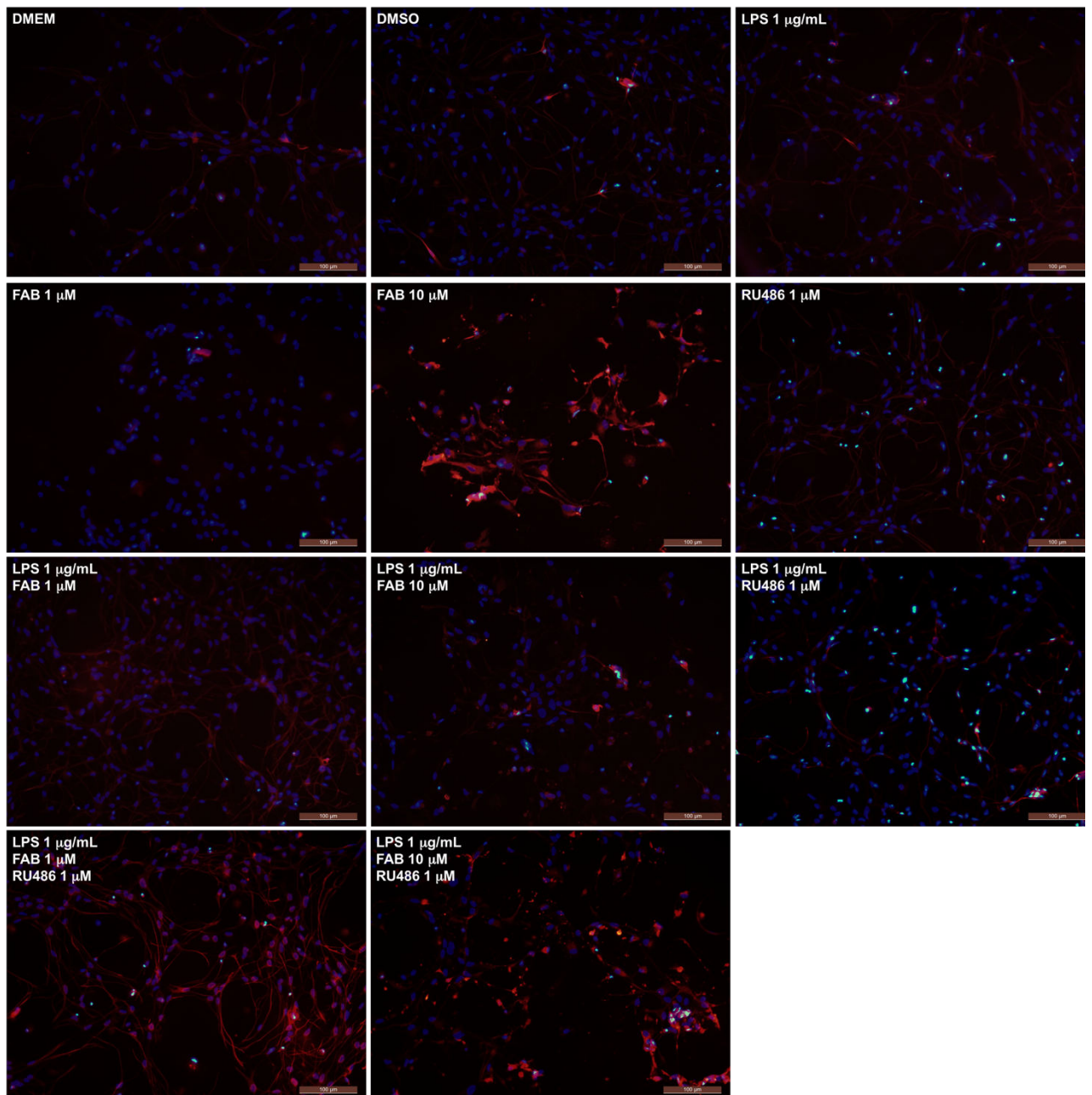


Figura 11. Marcação de células GFAP positivas e de núcleos marcados por DAPI através de imunocitoquímica. Cada foto representa o aspecto geral da cultura submetida aos diferentes tratamentos, com células GFAP positivas marcadas em vermelho (pelo anticorpo Alexa Fluor 592) e núcleos marcados em azul.

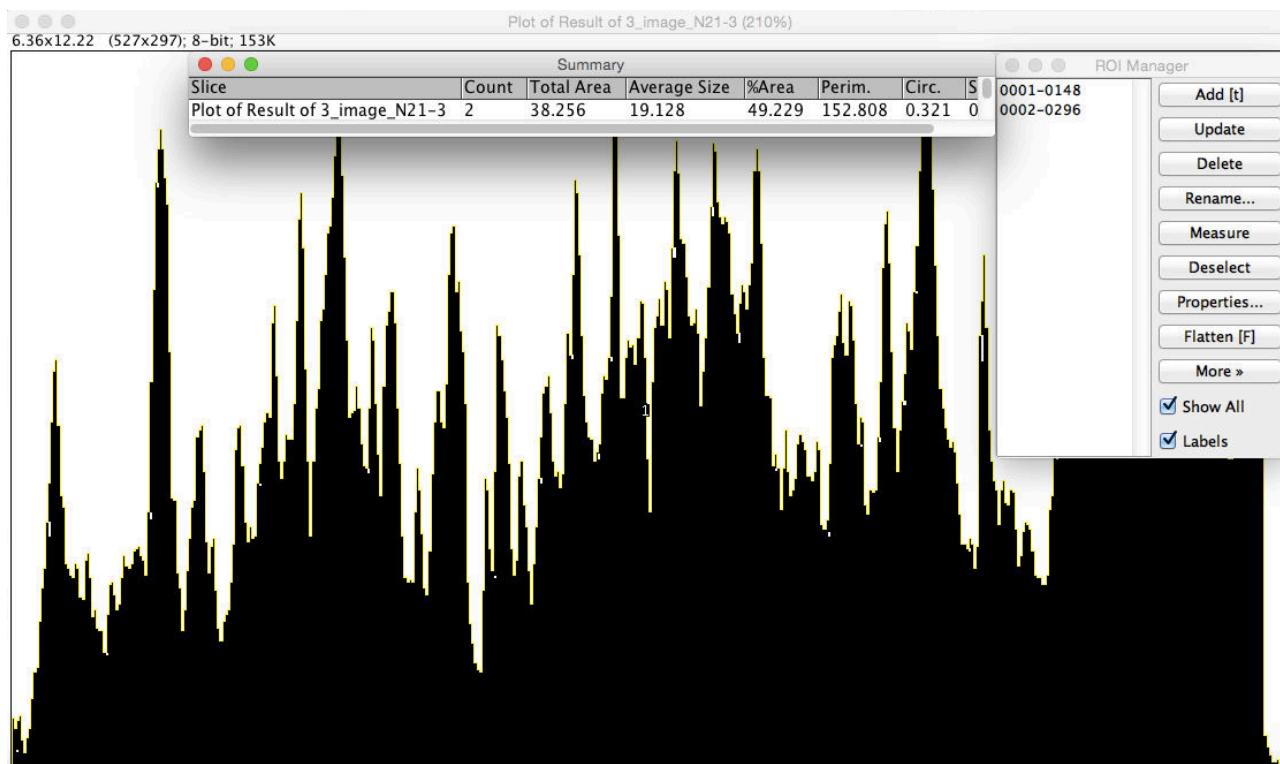


Figura 12. ROIs representando gráfico do total de valores de intensidade de uma imagem da marcação por GFAP. Os níveis de intensidade de cada imagem da marcação por GFAP foram plotados em um gráfico, que foi convertido a uma imagem binária. Esta conversão permitiu a atribuição de uma ou mais regiões de interesse (ROIs, identificadas pelos números) ao gráfico. A área total da(s) ROI(s) é exibida na coluna "Total Area" da tabela "Summary" e representa a área total do gráfico.

3.3.1 Análise densitométrica da marcação contra GFAP

A densitometria é a mensuração de variações no nível de intensidade dos pixels de uma imagem. Os valores de intensidade de cada pixel da imagem são plotados em um gráfico, de modo que sua área representa a intensidade total da imagem. A expressão de GFAP é proporcional à intensidade de fluorescência, o que nos permite comparar níveis de expressão de GFAP entre os grupos experimentais. Houve diferença significativa entre os pares de tratamentos: L+F1 e L+F1+R; L+F10 e L+F10+R. Os tratamentos L+F1, L+F10 e LPS não diferiram dos grupos controle. A presença de RU486, no contexto da inflamação e tratamento com FAB a 1 ou 10 μM , aumentou a expressão relativa de GFAP, sugerindo que FAB, através dos receptores de glicocorticoide e/ou progesterona, manteve a expressão de GFAP em níveis semelhantes aos dos controles e do tratamento com LPS (Figura 13).

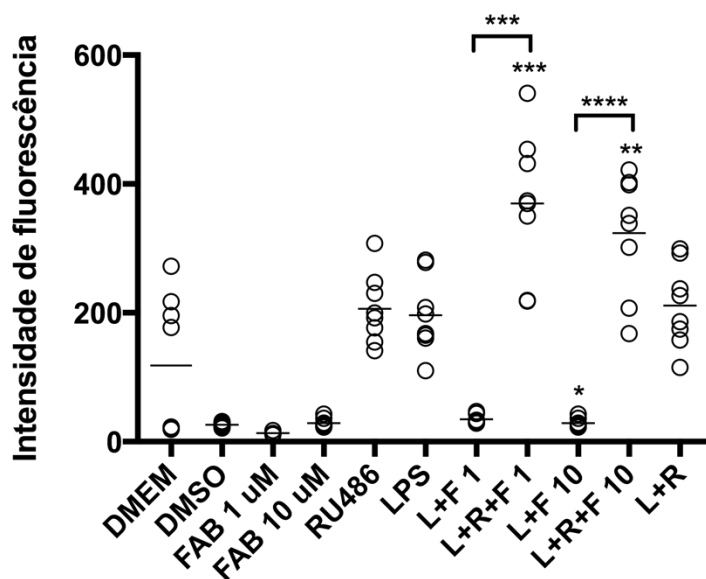


Figura 13. Perfis densitométricos entre os grupos experimentais. Os valores de intensidade total das imagens em cada grupo correspondem à área, em pixels, dos gráficos de intensidade de cada imagem. A área cada gráfico corresponde aos círculos individuais. As barras horizontais representam a intensidade média em cada grupo. Significância estatística calculada de acordo com teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$). Diferenças estabelecidas segundo os valores de P: ***P < 0,0001; **P < 0,001; *P < 0,05. Os asteriscos acima dos colchetes representam valores de significância entre os tratamentos ligados pelos colchetes. Os asteriscos abaixo dos colchetes representam valores de significância entre o tratamento e o controle DMEM.

4. DISCUSSÃO

Os resultados da análise da população microglial (seção 3.2.2) sugerem que a administração de RU486 em um contexto inflamatório (i.e. após 24 h de tratamento com LPS a 1 ug/mL, tratamento L+R) reduz significativamente a população microglial. Essa redução populacional é evitada por FAB a 1 uM, sugerindo que ele promove a sobrevivência e/ou proliferação microglial. Como esse efeito ocorre mesmo na presença de RU486, é possível inferir que esse mecanismo protetor é independente de GR.

O aumento significativo nos valores de TI da microglia (seção 3.2.3) em resposta à administração individual de FAB a 10 uM, mas não de FAB a 1 uM, sugerem que esse efeito é específico dessa concentração de FAB. De acordo com o teste do MTT, FAB não é citotóxico a 10 uM, mas reduziu a média das leituras de absorvância em relação ao controle. Em concordância com esse resultado, o número de núcleos marcados por DAPI e de células Iba-1 positivas foi reduzido significativamente em relação ao controle. Em conjunto,

esses resultados sugerem que as alterações morfológicas na microglia tratada com FAB a 10 uM podem ter ocorrido em resposta à morte de parte da população celular.

O perfil morfométrico de microglia *in vitro*, assim como a responsividade a estímulos de ativação, e.g. LPS, variam de acordo com a idade do animal da qual a microglia foi obtida (LAI et al., 2013), com o número de dias de cultivo (DIV) (SZABO & GULYA, 2013) e com o agente de ativação em si (LAI et al., 2013; FUJITA, 1996). A microglia de ratos neonatos ou com até 10 DIV tem perfil predominantemente ameboide, indicado pela predominância de células com TI < 3. Até 10 DIV, os valores de TI variam entre um e 15. Apenas a partir desse período há uma diversificação dos valores de TI, que passam a variar entre um e 50, podendo chegar a 81 (LAI et al., 2013; SZABO & GULYA, 2013). De acordo com Szabo e Gulya (2013), foi reportado por diferentes autores que o estresse sobre as células durante o processo de obtenção e lançamento da cultura contribui para tornar a microglia reativa e, portanto, ameboide. A microglia de ratos neonatos é também mais reativa a LPS e a ATP do que a de ratos jovens e idosos, respectivamente (LAI et al., 2013). Em concordância com esses dados, no nosso cultivo (5 DIV), não houve diferenças significativas para os valores de TI entre as condições controle e a maioria dos tratamentos experimentais.

A análise densitométrica demonstrou aumento da expressão relativa de GFAP aos tratamentos L+R+F1 e L+R+F10 em relação ao controle e aos tratamentos L+F1 e L+F10, respectivamente. Isso sugere que o aumento da expressão relativa de GFAP entre essas condições foi mediado, ao menos parcialmente, por GR. Entretanto, não houve alteração na expressão de GFAP nos tratamentos LPS, L+F1, L+F10 em relação às condições controle. Esses dados podem sugerir, alternativamente, que o aumento da expressão de GFAP ocorreu por uma via estimulada por FAB dependente, ao menos parcialmente, de GR.

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerados em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que, em cultura primária de células gliais corticais de ratos neonatos, FAB a 1 ou a 10 uM reduz a expressão relativa de GFAP através do receptor de glicocorticoide. Entretanto, apenas FAB a 10 uM alterou a morfologia microglial, mas esse efeito não foi mediado pelo receptor de glicocorticoide.

Este estudo corrobora a noção de que a interpretação dos dados morfométricos deve ser feita de acordo com o contexto experimental, visto que diferentes variáveis podem alterá-los. Essas variações podem ser explicadas, ao menos em parte, pela plasticidade da microglia. O mesmo pode ser inferido sobre a interpretação das mudanças relativas de expressão de GFAP devido à plasticidade também de astrócitos. Além disso, outras características morfológicas podem ser exploradas, e.g. a distribuição do sinal de fluorescência pode indicar padrões de organização locais do citoesqueleto. Essa abordagem é interessante também para analisar perfis morfológicos de astrócitos, por mensurar características locais e que, portanto, não dependem da delimitação do citoplasma de células individuais. O aumento do número de parâmetros morfológicos deve aumentar a quantidade de informações funcionais inferidas. O conhecimento dessa associação entre morfologia e função deve, por sua vez, gerar modelos *in vitro* que refletem condições *in vivo* com maior precisão. Esta associação está ainda menos clara no caso de astrócitos, cuja análise morfométrica é dificultada pela sobreposição dos corpos celulares e prolongamentos que impedem a distinção de células individuais. À medida que análises morfométricas forem incorporadas em diferentes contextos (e analisadas conjuntamente com estudos já publicados envolvendo morfologia, dados moleculares e de expressão gênica), diferentes perfis morfológicos serão mais informativos sobre as condições estudadas, tanto em estudos posteriores quanto na possível re-interpretação de dados já obtidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROEKE, Jurjen; PEREZ, Jose Maria Mateos; PASCAU, Javier. **Image processing with ImageJ**. Packt Publishing Ltd, 2015.

COHEN, Sheldon et al. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 5995-5999, 2012.

COSTA, Silvia Lima et al. Impact of plant-derived flavonoids on neurodegenerative diseases. **Neurotoxicity research**, v. 30, n. 1, p. 41-52, 2016.

DA SILVA, Alessandra Bispo et al. The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. **Chemico-biological interactions**, v. 274, p. 89-99, 2017.

DOS SANTOS SOUZA, Cleide et al. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. **Neurotoxicology**, 2018.

EREIFEJ, Evon S. et al. Comparative assessment of iridium oxide and platinum alloy wires using an in vitro glial scar assay. **Biomedical microdevices**, v. 15, n. 6, p. 917-924, 2013.

FUJITA, Hiroko et al. Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. **Glia**, v. 18, n. 4, p. 269-281, 1996.

GAO, Hui-Ming; HONG, Jau-Shyong. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends in immunology**, v. 29, n. 8, p. 357-365, 2008.

HANISCH, U. K. Factors controlling microglial activation. **Neuroglia**, 3rd edn. **Oxford University Press**, v. 48, p. 614-625, 2012.

JUSZCZAK, Grzegorz R.; STANKIEWICZ, Adrian M. Glucocorticoids, genes and brain function. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2017.

LAI, A. Y. et al. Distinct activation profiles in microglia of different ages: a systematic study in isolated embryonic to aged microglial cultures. **Neuroscience**, v. 254, p. 185-195, 2013.

LIN, Jiangkai; CAI, Wenqin. Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis. **Journal of neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1671-1682, 2004.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OLAJIDE, Olayemi Joseph et al. Cerebellar Molecular and Cellular Characterization in Rat Models of Alzheimer's Disease: Neuroprotective Mechanisms of Garcinia Biflavonoid Complex. **Annals of Neurosciences**, v. 24, n. 1, p. 32-45, 2017.

SANTOS, Cleonice C. et al. Aminochrome induces microglia and astrocyte activation. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 54-60, 2017.

SILVA, Bruno et al. Quercetin, kaempferol and biapigenin from hypericum perforatum are neuroprotective against excitotoxic insults. **Neurotoxicity research**, v. 13, n. 3-4, p. 265-279, 2008.

SOFRONIEW, Michael V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 638-647, 2009.

SOLANKI, Isha et al. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 6, n. 1, p. 64-72, 2015.

SZABO, M.; GULYA, K. Development of the microglial phenotype in culture. **Neuroscience**, v. 241, p. 280-295, 2013.

THAPA, Arjun et al. Biflavonoids are superior to monoflavonoids in inhibiting amyloid- β toxicity and fibrillogenesis via accumulation of nontoxic oligomer-like structures. **Biochemistry**, v. 50, n. 13, p. 2445-2455, 2011.

UNEMURA, Kazuhiro et al. Glucocorticoids decrease astrocyte numbers by reducing glucocorticoid receptor expression *in vitro* and *in vivo*. **Journal of pharmacological sciences**, v. 119, n. 1, p. 30-39, 2012.

VERKHRATSKY, A.; NODA, M. General physiology and pathophysiology of microglia. In: PETERSON, P. K.; TOBOREK, M. (Eds.). **Neuroinflammation and Neurodegeneration**. New York: Springer, 2014. p. 47-60.