

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Vitória Girelli de Oliveira

**RESPOSTA BIOENERGÉTICA MICROGLIAL APÓS TRAUMA  
CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2024

Vitória Girelli de Oliveira

**RESPOSTA BIOENERGÉTICA MICROGLIAL APÓS TRAUMA  
CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de [Bacharel\(a\)](#) em Biomedicina.

**Orientador:** Professor Doutor Luis Valmor Cruz  
Portela

**Co-orientador:** Doutor Nathan Ryzewski Strogulski

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Vitória  
RESPOSTA BIOENERGÉTICA MICROGLIAL APÓS TRAUMA  
CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS / Vitória de Oliveira.  
-- 2024.  
51 f.  
Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Coorientador: Nathan Ryzewski Strogulski.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. trauma cranioencefálico. 2. microglia. 3.  
respirometria. I. Valmor Cruz Portela, Luis, orient.  
II. Ryzewski Strogulski, Nathan, coorient. III.  
Título.

Vitória Girelli de Oliveira

## **RESPOSTA BIOENERGÉTICA MICROGLIAL APÓS TRAUMA CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Bacharel(a)** em Biomedicina.

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2024.

### **BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** **DIOGO LOSCH DE OLIVEIRA**  
Data: 01/03/2024 14:55:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Diogo Losch de Oliveira – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** **RACHEL KROLOW SANTOS SILVA BAST**  
Data: 04/03/2024 15:29:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Rachel Krolow Bast – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** **LUIS VALMOR CRUZ PORTELA**  
Data: 28/02/2024 13:44:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Luis Valmor Cruz Portela – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus exemplos de trabalho duro e persistência. À minha mãe, Sirlete, que me mostrou a importância dos estudos, e ao meu pai, Marcos, que me ensinou a não desistir e não me abalar, independente do que aconteça.

À minha irmã, Jéssica, por ter me mostrado que nem tudo precisa ser levado tão à sério e que devemos aproveitar a nossa vida independente das circunstâncias.

Aos meus colegas de laboratório – Gabriela, Jijo, Pedrinho, Afonso e Marcelo – pelo apoio nos experimentos, pelo companheirismo e pelos churrascos nos quais sempre faltava cacetinho (professor Roska, no próximo churrasco, por favor, compre mais pães!).

Aos funcionários do Mercado Paulista, que acompanharam minha trajetória e sempre me protegeram como uma irmã.

Ao meu coorientador e chefinho, Dr. Nathan Strogulski, pelas palavras de sabedoria, pelos ensinamentos, pela paciência e pelos *Penicillins* que bebemos pelos bares de Nova York.

Ao meu namorado e melhor amigo, Nathaniel, pelo companheirismo e apoio nessa etapa. Eu te amo!

Ao professor Roska, pelos ensinamentos, churrascos, risadas e os passeios na 5th Avenue. Independentemente do que aconteça, eu nunca vou esquecer do quão importante tu foste e continua sendo na minha vida. Eu desejo a todos que iniciam na carreira acadêmica um professor como tu. Pode ter certeza de que tu foste uma das melhores pessoas que já conheci na minha vida. Obrigada por apostar em mim!

“Biology gives you a brain.

Life turns it into a mind.”

Jeffrey Eugenides

## RESUMO

O trauma cranioencefálico (TCE) é uma lesão ao tecido cerebral causada por forças biomecânicas externas, como impactos diretos ao crânio, acelerações rotacionais bruscas da cabeça ou ondas de choque. Nos Estados Unidos, o Center for Disease Control and Prevention (CDC) estimou 190 óbitos diários relacionados ao TCE em 2021, enquanto no Brasil houve uma média anual de cerca de 131 mil internações associadas ao TCE entre 2009 e 2019. Os mecanismos patofisiológicos do TCE incluem injúria axonal, ativação de caspases, disfunção mitocondrial e neuroinflamação. Esses eventos desencadeiam danos secundários, como desequilíbrios iônicos, disfunção bioenergética e acúmulo de proteínas neurotóxicas, contribuindo para a progressão da neurodegeneração. A microglia, uma célula glial no sistema nervoso central, desempenha um papel central na resposta imune e na manutenção da homeostase cerebral. Ela possui dois fenótipos principais: M1, associado à resposta pró-inflamatória e metabolismo majoritariamente glicolítico, e M2, relacionado à resolução de inflamação e remodelamento tecidual. A respirometria é uma técnica que permite a medição da respiração celular através de um eletrodo de Clark, sendo crucial para investigar os processos metabólicos da microglia e de outras células em resposta ao TCE. Neste estudo, foram utilizados camundongos para investigar os efeitos do TCE na atividade bioenergética da microglia. Um protocolo de respirometria foi desenvolvido para analisar a respiração mitocondrial da microglia *ex vivo*. Camundongos machos CF1 foram divididos em dois grupos: animais SHAM, submetidos à anestesia; e animais TCE, submetidos a um protocolo de trauma cranioencefálico severo fechado. Os parâmetros biomecânicos foram profundidade (5 mm), velocidade (5,7 m/s), e tempo de permanência no local (0,1s) Após 24 horas do TCE, os camundongos foram perfundidos e as células microgliais foram isoladas. Os resultados mostraram que não houve mudanças significativas entre os grupos TCE e SHAM nos seguintes parâmetros: capacidade de reserva OxPhos, fluxo N/NS, capacidade de reserva, eficiência fosforilativa, controle de extravasamento e eficiência de acoplamento. No entanto, o potencial de membrana mitocondrial foi comprometido nos animais com TCE, indicando disfunção na formação e dissipação do potencial de membrana. Concluímos preliminarmente que a respiração mitocondrial não é afetada pelo TCE após 24 horas.

Palavras-chave: trauma cranioencefálico; microglia; respirometria.

## ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is an injury to the brain tissue caused by external biomechanical forces, such as direct impacts to the skull, sudden rotational accelerations of the head, or shock waves. In the United States, the Center for Disease Control and Prevention (CDC) estimated 190 daily deaths related to TBI in 2021, while in Brazil, there was an annual average of about 131 thousand hospitalizations associated with TBI between 2009 and 2019. The pathophysiological mechanisms of TBI include axonal injury, caspase activation, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation. These events trigger secondary damage, such as ionic imbalances, bioenergetic dysfunction, and accumulation of neurotoxic proteins, contributing to the progression of neurodegeneration. Microglia, a glial cell in the central nervous system, plays a central role in the immune response and maintenance of cerebral homeostasis. It has two main phenotypes: M1, associated with pro-inflammatory response and predominantly glycolytic metabolism, and M2, related to inflammation resolution and tissue remodeling. Respirometry is a technique that allows the measurement of cellular respiration through a Clark electrode, being crucial for investigating the metabolic processes of microglia and other cells in response to TBI. In this study, male CF1 mice were used to investigate the effects of TBI on the bioenergetic activity of microglia. A respirometry protocol was developed to analyze the mitochondrial respiration of microglia *ex vivo*. Mice were divided into two groups: SHAM animals, subjected to anesthesia, and TBI animals, subjected to a severe closed-head injury protocol. Biomechanical parameters were depth (5 mm), velocity (5.7 m/s), and dwell time (0.1s). Twenty hours after the TBI, mice were perfused, and microglial cells were isolated. The results showed no significant changes between the TBI and SHAM groups in the following parameters: OxPhos reserve capacity, N/NS flux, reserve capacity, phosphorylative efficiency, leak control, and coupling efficiency. Nevertheless, mitochondrial membrane potential was compromised in TBI animals, indicating dysfunction in the formation and dissipation of the membrane potential. Thus, we conclude that mitochondrial respiration is not affected by TBI after 24 hours.

Keywords: traumatic brain injury; microglia; respirometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais causas do TCE .....	12
Figura 2 – Danos secundários ocasionados pelo TCE .....	13
Figura 3 – Fenótipos Microgliais .....	14
Figura 4 – Metabolismo das células imunes ativadas .....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg1 - Arginase 1

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CD11b - Integrina alfa M

CD40 - Cluster de diferenciação 40

ECG - Escala de Coma de Glasgow

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FADH<sub>2</sub> - Dinucleotídeo de flavina e adenina

FGF – Fibroblast growth factor

Hif-1 $\alpha$  - Fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$

IGF-1 – Insulin growth factor 1

IL-1 $\alpha$  - Interleucina 1 $\alpha$

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-23 - Interleucina 23

iNOS - Óxido nítrico sintase

mTOR - Proteína alvo da rapamicina

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NGF – Nerve-derived growth factor

NOX2 - NADPH oxidase 2

Omy - Oligomicina

OxPhos - Fosforilação Oxidativa

PKM2 - Piruvato quinase M2

PMG - Piruvato, malato e glutamato

Suc - Succinato

SNC - Sistema Nervoso Central

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## SUMÁRIO

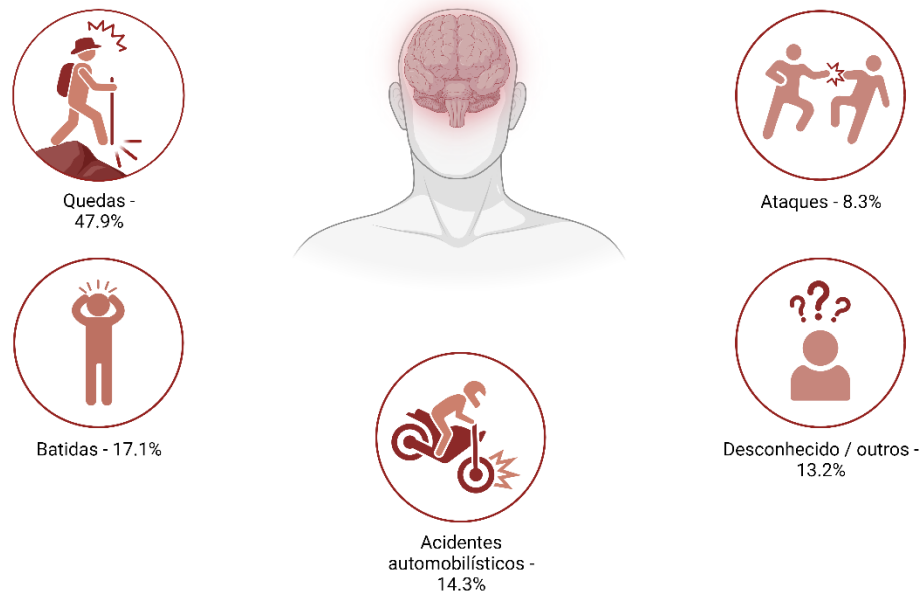
1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	JUSTIFICATIVA .....	18
1.2	OBJETIVOS .....	19
1.2.1	Objetivo geral .....	19
1.2.2	Objetivos específicos .....	19
2	ARTIGO CIENTÍFICO .....	20
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	35
	REFERÊNCIAS .....	36
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O trauma cranioencefálico (TCE) representa uma lesão ao tecido cerebral, originada por forças biomecânicas externas, tais como impactos diretos ao crânio, acelerações e desacelerações rotacionais bruscas da cabeça, ou ondas de choque resultantes de deslocamentos do ar. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), maior parte dos traumas cranioencefálicos são ocasionados por quedas (47.9%), seguido de batidas, acidentes automobilísticos, e motivos desconhecidos (*Surveillance Report of Traumatic Brain Injury-related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths, 2019*) (figura 1). O TCE pode ser classificado como aberto ou fechado, dependendo da presença ou ausência de objetos penetrantes. Clinicamente, a gravidade do TCE é avaliada pela escala de coma de Glasgow (ECG), que caracteriza as lesões como leves, moderadas ou severas, considerando fatores clínicos como a duração, intensidade, natureza e a direção da lesão, além da presença de amnésia ou sintomas neurológicos (Blennow *et al.*, 2016).

A prevalência do TCE é alarmante. Nos Estados Unidos, dados do CDC apontam para uma estimativa de 190 óbitos diários relacionados a lesões por TCE em 2021 (*Get the Facts About TBI, 2023*). Segundo dados do DATASUS, foram relatados 1.142 casos de TCE moderado em dezembro de 2023 nas capitais brasileiras. Dentre os desfechos mais comuns associados ao TCE estão alterações cognitivas e psiquiátricas, morte prematura e sequelas físicas que impactam a qualidade de vida dos sobreviventes (Blennow *et al.*, 2016). Além disso, estudos indicam uma associação entre TCE e aumento do risco de demência (Nordström; Nordström, 2018; Nordstrom *et al.*, 2014).

**Figura 1 – Principais causas do TCE**



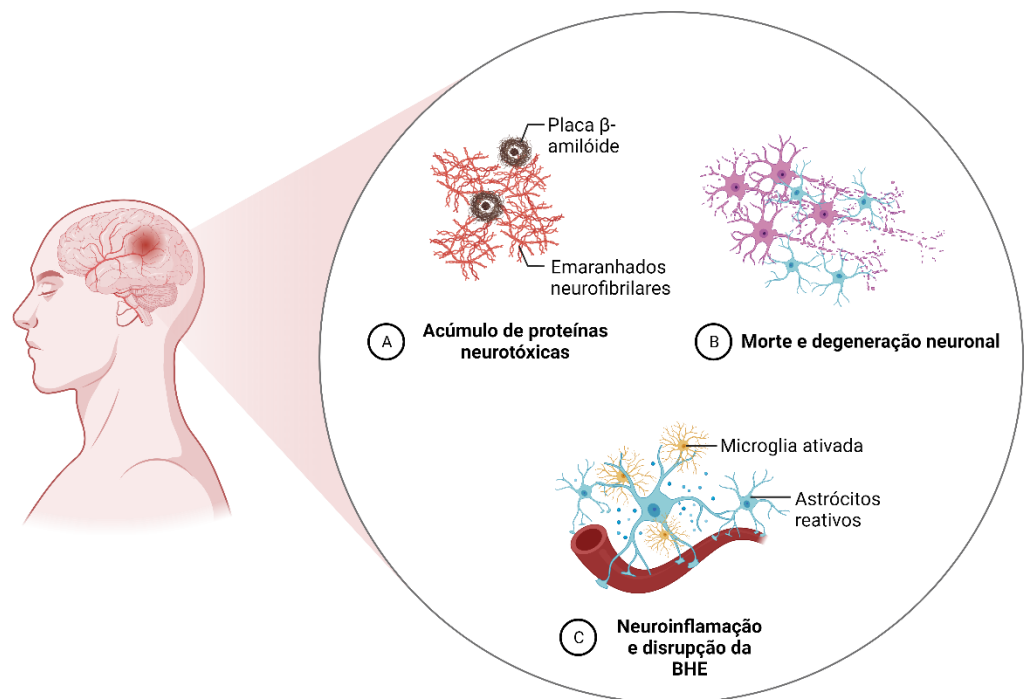
Fonte: elaborada pela autora. Dados do *Centers for Disease Control and Prevention*.

O cisalhamento do tecido cerebral após o TCE desencadeia uma série de eventos fisiopatológicos, incluindo injúria axonal, microporação de membranas, extravasamento de íons, edema celular, ativação de caspases e proteólise do citoesqueleto (Blennow *et al.*, 2016; Blennow; Hardy; Zetterberg, 2012; Johnson; Stewart; Smith, 2013a). Esses eventos desencadeiam mecanismos bioquímicos secundários, como disfunção mitocondrial, desequilíbrio iônico, formação de agregados proteicos e de espécies reativas de oxigênio (EROs) e neuroinflamação, levando à neurodegeneração a longo prazo (Fischer *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017) (figura 2).

No cenário da patologia do TCE, as mitocôndrias desempenham um papel central na regulação da sobrevivência ou morte celular. Três vias principais – extrínseca, mitocondrial e apoptótica mediada por caspase-12 – participam do processo de morte celular. Além disso, disfunção mitocondrial induzida pelo TCE manifesta-se por comprometimentos bioenergéticos, indicando uma desregulação ou ineficiência nos componentes da maquinaria bioenergética. Dessa forma, as investigações concentram-se na análise da capacidade de transferência de elétrons entre os complexos respiratórios, no potencial eletroquímico e na influência de cada

um dos referidos complexos no processo global de síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (Cheng *et al.*, 2012).

**Figura 2 – Danos secundários ocasionados pelo TCE**

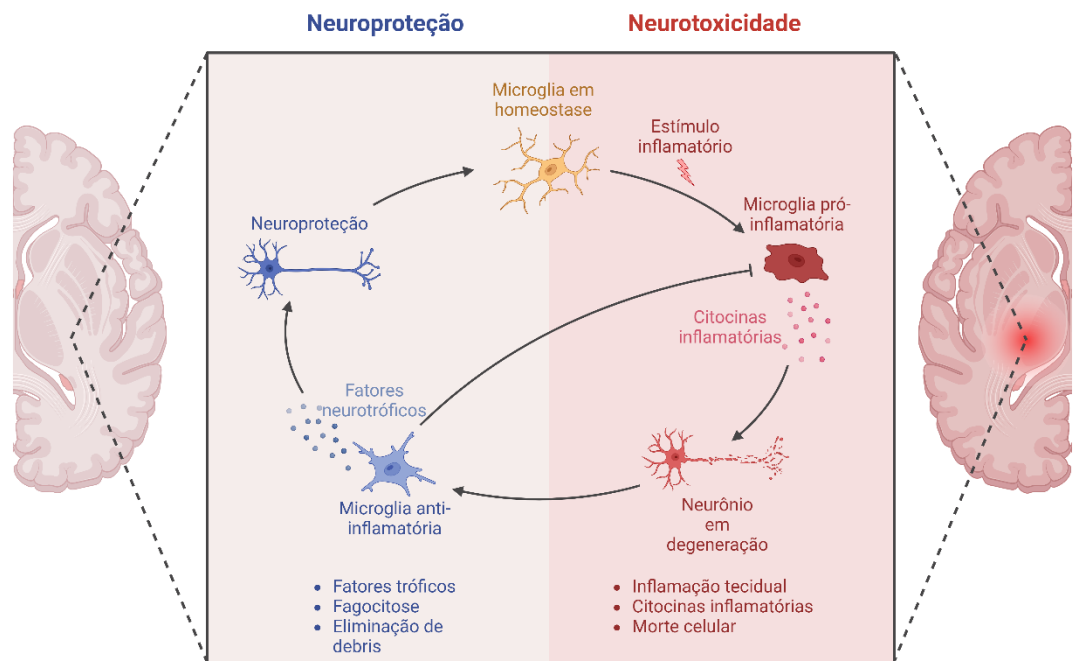


Fonte: elaborada pela autora.

A microglia, célula glial com propriedades imunes no sistema nervoso central (SNC), desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase cerebral, realizando atividades essenciais, tais como a eliminação de resíduos celulares, agregados proteicos e outras substâncias tóxicas por meio do processo de fagocitose, além de modular a resposta inflamatória frente ao dano neuronal (Colonna; Butovsky, 2017). Em condições fisiológicas, a microglia adota um fenótipo de monitoramento quiescente, notável pela expressão de microRNA-124 e integrina alfa M (CD11b), com uma menor expressão de CD46 (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005). No entanto, em resposta a diversos estímulos, a microglia passa por uma alteração em seu fenótipo, primordialmente categorizada em dois estados distintos: M1 e M2 (Guo; Wang; Yin, 2022) (figura 3). A microglia M1 é responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-1a, IL-12 e IL-23, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), bem como pela expressão de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

oxidase (NOX2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e cluster de diferenciação 40 (CD40)(Boche; Perry; Nicoll, 2013; Colton; Wilcock, 2010; Hanisch; Kettenmann, 2007; Kumar *et al.*, 2016). Por outro lado, a microglia M2 desempenha funções vitais em diversas respostas imunológicas, abrangendo reações alérgicas, resposta a parasitas, resolução de processos inflamatórios, remodelamento tecidual, angiogênese, imunorregulação e promoção tumoral (Sica; Mantovani, 2012), mediadas por fatores como IL-4, IL-13, IL-10 e arginase-1 (Arg1) (Cherry; Olschowka; O'Banion, 2015; Gordon, 2003; Sica; Mantovani, 2012).

**Figura 3 -Fenótipos Microgliais**



Fonte: elaborada pela autora.

Após o TCE, a microglia atinge seu pico de ativação após sete dias, podendo permanecer ativada por meses e até anos (Loane; Byrnes, 2010; Turtzo *et al.*, 2014). A exposição contínua a estímulos inflamatórios pode resultar em tolerância imune, um fenômeno no qual as células imunes, incluindo as microgliais, tornam-se menos responsivas a estímulos subsequentes. Embora a tolerância imune reduza o dano tecidual causado pela resposta inflamatória excessiva, está associada à disfunção das células imunes e à neurodegeneração a longo prazo (Biswas; Lopez-Collazo, 2009; Dams-O'Connor *et al.*, 2016; Julien *et al.*, 2017).

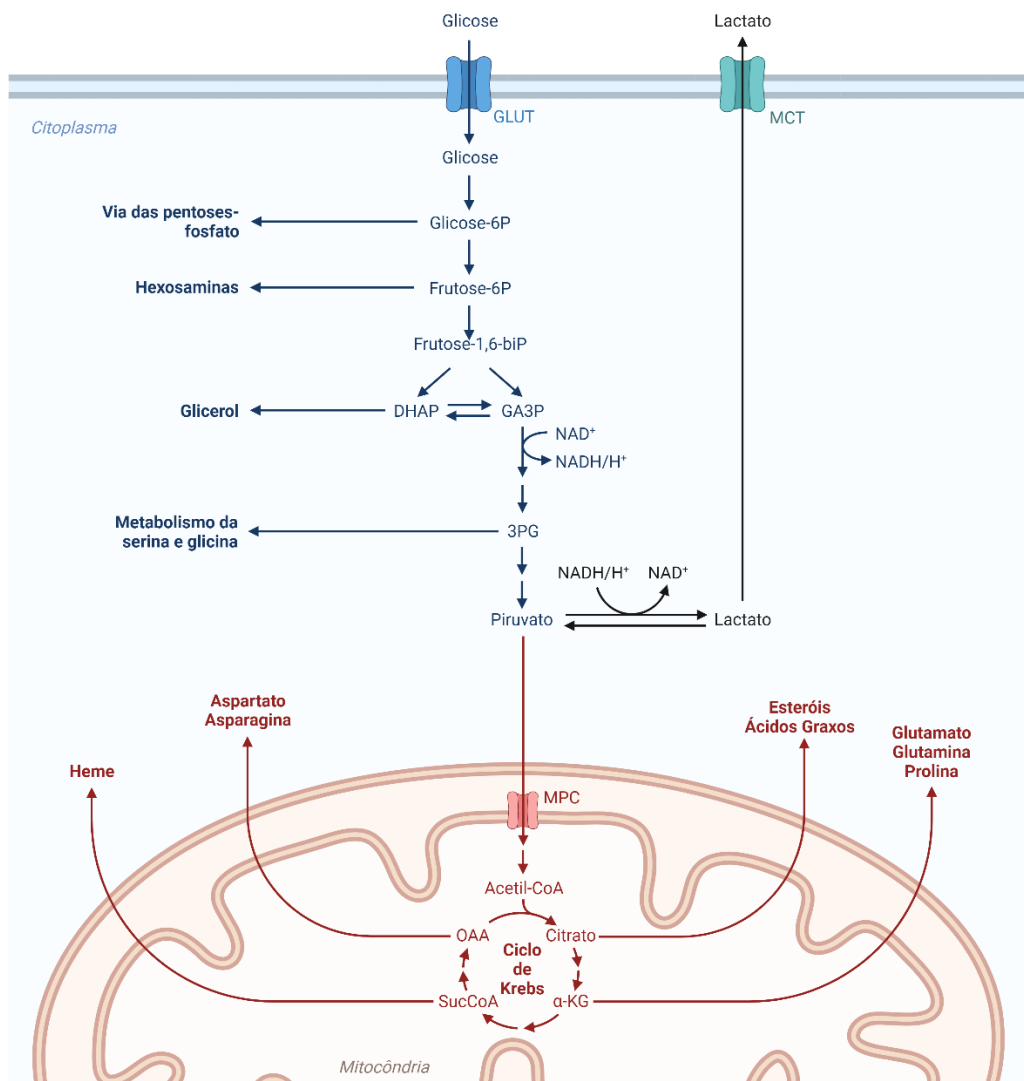
O dano tecidual resultante do TCE, juntamente com processos celulares subsequentes, conduz a um aumento da captação de glicose pelos neurônios e células gliais para síntese de ATP e outros intermediários necessários para as reações biossintéticas envolvidas na recuperação celular (Xu *et al.*, 2021). A captação de glicose do meio extracelular e seu subsequente processamento no citosol são fundamentais para a síntese de piruvato e intermediários biossintéticos, além da concomitante redução de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , um cofator essencial para diversas enzimas. O ciclo do ácido tricarboxílico, conhecido como ciclo de Krebs, ocorre na matriz mitocondrial e tem como objetivo gerar  $\text{NADH}$  e  $\text{FADH}_2$  para a cadeia de transporte de elétrons, culminando na síntese de ATP, além de outros intermediários. Enquanto a glicólise tem a vantagem de produzir rapidamente 2 ATPs e fornecer intermediários biossintéticos para o crescimento celular acelerado, a fosforilação oxidativa (OxPhos) produz 36 ATPs através de uma maquinaria metabólica eficiente, mas muito mais complexa.

Em contextos imunológicos, as células T e os macrófagos ativados exibem um aumento na atividade glicolítica, essencial para a síntese de intermediários biossintéticos necessários ao crescimento e à proliferação das células de defesa (Michalek *et al.*, 2011; Newsholme *et al.*, 1986; O'Neill; Kishton; Rathmell, 2016; Rodríguez-Prados *et al.*, 2010) (Figura 4). Em um estudo conduzido por Tannahill *et al.* (2013), a inibição da via glicolítica utilizando 2-desoxiglicose, um análogo da glicose que inibe a via glicolítica, demonstrou a capacidade de inibir a ativação de macrófagos *in vitro* e reduzir a inflamação *in vivo*. Em outro estudo, o estímulo com lipopolissacarídeo resultou no aumento da expressão do fator induzível por hipóxia (Hif-1a) e da piruvato quinase M2 (PKM2) (Palsson-Mcdermott *et al.*, 2015). No cenário inflamatório, a PKM2 regula e atenua o fluxo glicolítico, desviando intermediários para vias biossintéticas e interagindo com Hif-1a quando translocada para o núcleo, promovendo a expressão de genes correlatos. A indução do estado tetramérico da PKM2, que impede sua entrada no núcleo, revelou eficácia na reprogramação de macrófagos para o estado M2 (Palsson-Mcdermott *et al.*, 2015), sendo a inibição de Hif-1a também uma abordagem efetiva. O ciclo de Krebs nos macrófagos M2 permanece íntegro e associado à fosforilação oxidativa, enquanto nos macrófagos M1, ocorrem interrupções após o citrato e o succinato (Jha *et al.*, 2015; Tannahill *et al.*, 2013). Nessas circunstâncias, o citrato é exportado da mitocôndria para a síntese de ácidos graxos, utilizados na biogênese de membranas, ou desviado para a produção de óxido nítrico e prostaglandinas (Infantino *et al.*, 2011). O succinato inibe prolil-hidroxilases, estabilizando o Hif-1a no núcleo e aumentando a produção de  $\text{Il-1}\beta$ , representando um mecanismo de ativação de Hif-1a em condições aeróbias (Tannahill *et al.*, 2013). Dessa forma,



em condições de estresse celular, o metabolismo celular tende a se reprogramar para proporcionar um ambiente celular majoritariamente glicolítico. Além disso, o aumento da atividade glicolítica (hiper glicólise) está associado ao aumento da sinalização da via alvo mamífero da rapamicina (mTOR)-Hif-1a (Sun *et al.*, 2024).

**Figura 4 – Metabolismo das células imunes ativadas**



Fonte: elaborada pela autora.

A percepção dos imunologistas de que a reprogramação metabólica exerce influência não apenas na provisão de energia na forma de ATP, mas também na diferenciação, função e destino celular, tem suscitado um interesse crescente em abordagens diversificadas para a investigação do imunometabolismo. Nesse contexto, a abordagem do imunometabolismo segue

um processo sistemático composto por três fases distintas: a etapa de descoberta, que faz uso de técnicas como cultura celular, expressão gênica, metabolômica e single-cell RNA-seq; a fase de caracterização fenotípica, que envolve técnicas como citometria de fluxo, microscopia eletrônica e respirometria; e, por último, a etapa de confirmação, que engloba a validação gênica em modelos animais (Voss *et al.*, 2021). A técnica de respirometria possibilita a avaliação da atividade de cada complexo do sistema de transporte de elétrons e é conduzida por meio de equipamentos específicos, como o Oroboros O2k Fluorespirometer e Agilent Seahorse. Embora muitos estudos façam uso de modelos de cultura celular, a opção pelo isolamento *ex vivo* de microglia é preferível devido à sua maior fidelidade às condições fisiológicas. Contudo, a variabilidade nos procedimentos experimentais pode comprometer a precisão das conclusões obtidas. Para aprimorar a técnica, torna-se necessário adotar protocolos de controle de qualidade, otimizar as condições experimentais e seguir as diretrizes estabelecidas, garantindo, assim, uma análise metabólica microglial mais robusta e precisa (Strogulski *et al.*, 2023).

Em suma, os mecanismos de resposta inflamatória são intrinsecamente dependentes de processos neurobioquímicos e vias de sinalização celular que envolvem a disponibilidade de intermediários metabólicos e adenosina trifosfato. Nesse contexto, as mitocôndrias das células imunes são reconhecidas como a "usina de força da imunidade", coordenando as demandas energéticas associadas aos desafios imunológicos por meio do balanço entre a fosforilação oxidativa e a glicólise. Dessa forma, essas adaptações metabólicas desempenham um papel significativo na regulação da resposta neuroimune, destacando a mitocôndria como um regulador chave da neuroinflamação após o traumatismo cranioencefálico.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O trauma cranioencefálico é uma condição complexa associada a uma série de desafios mecânicos e clínicos, incluindo alterações cognitivas, sequelas físicas e aumento do risco de demência. Em resposta ao TCE, a microglia desencadeia uma série de eventos imunológicos acoplados ao metabolismo, influenciando diretamente a resposta inflamatória, os processos de reparo neuronal e os desfechos neurofuncionais. A transição entre fenótipos M1 e M2, suas respostas imunológicas distintas, a disfunção mitocondrial e a ativação prolongada são elementos marcantes da resposta pós-TCE. Além disso, a influência da reprogramação metabólica nas funções da microglia representa um campo emergente de pesquisa, uma vez que a interseção entre o metabolismo celular e a resposta imunológica pode oferecer insights valiosos para potenciais alvos terapêuticos.

Considerando o impacto significativo do TCE na saúde pública, a investigação do imunometabolismo microglial proporciona não apenas uma compreensão mais profunda dos mecanismos patofisiológicos, mas também abre portas para intervenções terapêuticas direcionadas. Dessa forma, este trabalho contribui para a construção de uma base científica para a abordagem clínica e o desenvolvimento de terapias para pacientes afetados pelo TCE.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um protocolo para análise respirométrica da microglia *ex vivo* e investigar o impacto do trauma crânioencefálico moderado no metabolismo microglial de camundongos.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- a) Investigar a expressão de marcadores de atividade glicolítica;
- b) investigar a atividade dos complexos I, II, IV e V da cadeia respiratória mitocondrial, analisando o consumo de oxigênio em resposta a substratos e inibidores específicos dos complexos;
- c) avaliar a formação e dissipação do potencial de membrana mitocondrial na microglia.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Redigido conforme as normas de publicação do periódico *Journal of Neurochemistry*.

### **RESPOSTA BIOENERGÉTICA MICROGLIAL APÓS TRAUMA CRANIOENCEFÁLICO EM CAMUNDONGOS**

Vitória Girelli de Oliveira<sup>1</sup>, Gabriela Cabral Soares<sup>1</sup>, Afonso Kopczynski de  
Carvalho<sup>1</sup>, Marcelo Salimen Rodolphi<sup>1</sup>, Jijo Stebin Justus<sup>1</sup>, Douglas H. Smith<sup>3</sup>, Nathan  
Ryzewski Stroguski<sup>2</sup>, Luis Valmor Cruz Portela<sup>1</sup>

1. Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores - Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. School of Biochemistry and Immunology, Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland.
3. Penn Center For Brain Injury and Repair, University of Pennsylvania.

Correspondência:

Dr. Luis V. Portela, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: 55 51 33085558; Fax: 55 51 33085544;

E-mail: roskaportela@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

O trauma cranioencefálico (TCE) é caracterizado por uma lesão ao tecido cerebral resultante de forças biomecânicas externas, como impactos diretos ao crânio, acelerações rotacionais bruscas da cabeça, ou ondas de choque. Nos Estados Unidos, dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) revelam uma estimativa alarmante de 190 óbitos diários relacionados a lesões por TCE em 2021 *Get the Facts About TBI 2023*. No Brasil, entre 2009 e 2019, a média anual foi de aproximadamente 131 mil internações associadas ao TCE (Carteri; Silva, 2021). A incidência do trauma revela uma realidade preocupante, com consequências não apenas imediatas, mas também a longo prazo, incluindo alterações cognitivas, psiquiátricas e um aumento associado ao risco de demência (Nordström; Nordström, 2018; Nordstrom *et al.*, 2014).

Os eventos fisiopatológicos desencadeados pelo TCE, como injúria axonal, ativação de caspases, disfunção mitocondrial e neuroinflamação, contribuem para a progressão da neurodegeneração (Blennow *et al.*, 2016; Blennow; Hardy; Zetterberg, 2012; Johnson; Stewart; Smith, 2013b). Dentre as células envolvidas nesse processo, a microglia, célula glial no sistema nervoso central, assume um papel central na resposta imune e na manutenção da homeostase cerebral (Kumar *et al.*, 2016; Loane; Kumar, 2016).

A transição de estados na microglia é essencial para entender a resposta após um TCE. Em condições fisiológicas, ela mantém um estado vigilante, desempenhando funções cruciais na defesa celular, fagocitose, suporte à diferenciação neuronal, mielinização e nas funções cognitivas. Entretanto, diante de diferentes estímulos, a microglia pode adotar dois estados: M1 e M2 (Guo; Wang; Yin, 2022). O fenótipo M1 está associado a citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , e expressão de NOX2, iNOS e CD40 (Colonna; Butovsky, 2017). Por outro lado, a microglia M2 desempenha papel vital em processos como resolução de inflamação, remodelamento tecidual e angiogênese, mediados pelas interleucinas IL-4, IL-13, IL-10, arginase-1, bem fatores de crescimento (*insulin growth factor 1*, IGF-1; *fibroblast growth factor*, FGF) e neurotróficos (*nerve-derived growth factor*, NGF; fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF) (Colonna; Butovsky, 2017; Sica; Mantovani, 2012). Além disso, um aspecto crucial na transição de fenótipos microglial é o remodelamento

metabólico, no qual a análise da microglia revela adaptações celulares essenciais para a sobrevivência e função frente a injúrias.

Estudos indicam que, em condições inflamatórias, células como macrófagos ativados aumentam sua atividade glicolítica para fornecer energia necessária ao crescimento e à proliferação celular (Hemonnot-Girard *et al.*, 2022; Newsholme *et al.*, 1986; O'Neill; Kishton; Rathmell, 2016; Xu *et al.*, 2021). A transição para um estado glicolítico é mediada por vias metabólicas específicas, como a ativação de fatores como o fator induzível por hipóxia 1  $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) e a regulação pela enzima piruvato quinase M2 (PKM2) (Palsson-Mcdermott *et al.*, 2015). Entender como essa transição ocorre nas células microgliciais é crucial para desvendar os mecanismos subjacentes ao impacto metabólico do TCE.

A respirometria de alta resolução (*high resolution respirometry*, HRR) é uma abordagem de pesquisa mitocondrial e celular que, através do equipamento Oroboros O2k, possibilita a medição da respiração em diferentes preparações mitocondriais e células vivas (Gnaiger, 2014). Ao adotar uma análise respirométrica, buscamos não apenas compreender as alterações bioenergéticas nas mitocôndrias da microglia pós-TCE, mas também estabelecer um protocolo que assegure a fidelidade aos contextos fisiológicos. Esta abordagem se alinha com as tendências recentes em imunometabolismo, destacando a interconexão entre os processos metabólicos e a resposta inflamatória (Strogulski *et al.*, 2023; Voss *et al.*, 2021).

Sendo assim, neste estudo objetivamos preencher as lacunas do entendimento dos mecanismos metabólicos específicos que ocorrem na microglia pós-TCE, desenvolvendo um protocolo para a análise respirométrica da microglia *ex vivo*, além de investigar os efeitos de um trauma cranioencefálico severo na microglia de camundongos. Ao compreender a resposta da microglia e dos processos metabólicos envolvidos, almejamos contribuir para a compreensão da patogênese do TCE e abrir novas perspectivas terapêuticas para essa condição.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 ANIMAIS**

Camundongos CF1 de 90 dias de idade, totalizando 8 animais, foram distribuídos em 2 grupos: SHAM e TCE. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS e ficaram em ambiente com

temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), ciclo claro e escuro de 12 horas, com livre acesso a comida e água. Todas as etapas experimentais deste estudo seguiram as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, sob o número 40077.

## **2.2 INDUÇÃO DO TCE**

Para indução do TCE, utilizou-se o equipamento myNeuroLab®, Leica, St. Louis, MO, USA. Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano 3% para garantir sedação durante o procedimento. Em seguida, foram posicionados em um estereotáxico para assegurar que suas cabeças estivessem alinhadas para receber o impacto, com parâmetros específicos de velocidade, profundidade anteroposterior e tempo de permanência no local do dano (adaptado de Smith et al., 1995). Foi administrado um único trauma. Os animais do grupo SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento de anestesia e alocação no estereotáxico, mas não sofreram o trauma. Posteriormente, os animais repousaram em um colchão aquecido até a recuperação da consciência, antes de serem retornados às suas caixas.

## **2.3 PERFUSÃO**

Após 24 horas do TCE, os camundongos foram perfundidos transcárdialmente com 20 mL de HBSS gelado para que os macrófagos da corrente sanguínea não interfiram no isolamento. O cérebro foi dissecado e mantido em HBSS gelado até o momento da homogeneização (Herron et al. 2022).

## **2.4 FRACIONAMENTO CELULAR**

O isolamento da microglia *ex vivo* foi realizado conforme Herron et al. (2022). Brevemente, o cérebro foi removido e cuidadosamente homogeneizado em HBSS com 30 strokes. Após centrifugação a 350g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, a amostra foi ressuspendida em Percoll 37% e cuidadosamente adicionada sobre Percoll 70%. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 800 g a  $23^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos. Após essa etapa, a interface rica em microglia foi coletada, centrifugada a 350 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, e ressuspendida em tampão HBSS.

## **2.5 PAINEL MITOCONDRIAL**

Para avaliação do perfil bioenergético da microglia, foi realizada a respirometria de alta resolução em tempo real, utilizando o Oroboros O2k-oxygraph. Foram adicionados 500uL de



amostra a cada cuba. Um protocolo envolvendo com substratos, desacopladores e inibidores (SDI) do sistema de transporte de elétrons (STE) foi empregado (Gnaiger, 2014). As análises foram realizadas em uma solução tampão contendo EDTA 0.73mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM, HEPES 20mM e Manitol 320mM (pH 7.4), com resultados normalizados pelo conteúdo de proteínas. Todas as análises foram realizadas em cubas de 2mL vedadas, a uma temperatura constante de 37°C.

O procedimento consistiu na estabilização da amostra por 10 minutos, seguida pela adição de Piruvato, Malato e Glutamato (PMG) a 4mM. Após estabilização, foi introduzido ADP a 2,5mM, seguido pela adição de Succinato a 2mM e novamente 2,5mM de ADP. A Oligomicina (2ug) foi então adicionada para obter a respiração não fosforilativa (Lomy), seguida pela adição do ionóforo CCCP (0,1mM) para avaliar a capacidade máxima do STE (E)(Fig 1). Inibidores específicos dos complexos (Rotenona, Malonato, Antimicina-A e Azida Sódica) foram adicionados para avaliar o consumo de O<sub>2</sub> extra-mitocondrial. O fluxo de consumo de oxigênio por complexo, a eficiência bioquímica mitocondrial, a capacidade de reserva OxPhos, a capacidade do STE, a eficiência de acoplamento e o extravasamento de prótons H<sup>+</sup> foram calculados com base nos resultados obtidos (Carteri *et al.*, 2019a; Gnaiger, 2014).

O ensaio de potencial de membrana  $\Delta\Psi_m$  (Safranina- O) foi realizado na microglia isolada, seguindo o mesmo protocolo sequencial de SDI da respirometria. A variação dos pontos subsequentes foi calculada para mensurar o fluxo de formação e dissipação do potencial de membrana mitocondrial utilizando um espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices) com comprimentos de onda de excitação de 495nm e emissão de 586nm. As amostras foram incubadas na mesma solução tampão da respirometria com a adição de 10 $\mu$ M de Safranina-O. Números positivos indicam uma diminuição na  $\Delta\Psi_m$ , enquanto números negativos indicam um aumento na  $\Delta\Psi_m$ . O branco foi realizado apenas com adição de solução tampão e safranina-O. As amostras foram normalizadas pela concentração de proteínas (Carteri *et al.*, 2019a).

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste T de Student para comparação entre os grupos. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 10.1.2. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### *3.1 Protocolo de respirometria microglial ex vivo de camundongos*

Os resultados indicaram a eficácia do protocolo de respirometria, evidenciada pelo aumento do consumo de oxigênio após o estímulo com substratos (PMG, ADP, Succinato e ADP), pela redução do consumo de oxigênio após a adição de oligomicina um inibidor da ATP-sintase, e pelo subsequente aumento no consumo de oxigênio após a administração do desacoplador FCCP (Fig 1).

#### *3.2 Não houve mudanças significativas na análise respirométrica microglial 24 horas após o trauma cranioencefálico*

A capacidade de reserva da fosforilação oxidativa (OxPhos) é definida como a diferença entre a respiração OxPhos máxima (P) e a respiração basal (R), representando a capacidade disponível para um aumento na OxPhos, além da taxa da respiração basal. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos TCE e SHAM ( $P=0.2829$ ,  $t=1.179$ ,  $df=6$ , Fig 2a).

A eficiência de controle da via NS-N quantifica a alteração fracionária no fluxo quando o succinato é adicionado à respiração associada à via N. N e NS referem-se, respectivamente, à respiração N (com Piruvato, Malato, Glutamato ou outros substratos ligados ao CI) e NS (N em combinação com succinato). É dado por  $N/NS$ . Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e TCE ( $P=0.0532$ ,  $t=2.401$ ,  $df=6$ , Fig 2b).

A capacidade de reserva expressa a diferença entre capacidade máxima de respiração (E), obtida pela titulação com um desacoplador, e a respiração basal (R), dividida por E. Quando não há capacidade sobressalente,  $E-R$  é igual a 0, enquanto é igual a 1 quando o limite máximo é atingido. Considerando que a capacidade E é significativamente maior que a capacidade OxPhos, a capacidade de reserva não tem a finalidade de aumentar a fosforilação oxidativa, mas sim indica uma reserva para a respiração desacoplada. Não houve diferença significativa entre os grupos SHAM e TCE ( $P=0.9963$ ,  $t=0.004792$ ,  $df=6$ , Fig 2c, com ambos os grupos com médias próximas a 0.6, indicando uma grande capacidade sobressalente).

A eficiência fosforilativa é calculada como a diferença entre capacidade máxima de OxPhos (P) e a respiração LEAK, na qual a ATP-sintase está inibida, dividida pela capacidade

máxima P. Representa a capacidade respiratória mitocondrial relacionada diretamente com a fosforilação de ADP. Não houve diferença significativa entre a eficiência fosforilativa dos grupos SHAM e TCE ( $P=0.0876$ ,  $t=1.084$ ,  $df=6$ , Fig 2d).

O controle de extravasamento  $(E-L)/P$  mede a proporção de consumo de oxigênio que não é utilizado para fosforilação, denotado como  $(E-L)$ , em relação à taxa máxima de consumo de oxigênio (P), e fornece dados sobre a eficiência do sistema de fosforilação em utilizar o oxigênio disponível para a síntese de ATP. Não houve diferença no controle de extravasamento entre os grupos SHAM e TCE ( $P=0.0774$ ,  $t=2.128$ ,  $df=6$ , Fig 2d).

A respiração LEAK (L), observada na ausência de estímulo por ADP, representa a respiração não-fosforilativa das mitocôndrias. A eficiência de acoplamento, por outro lado, mede a eficiência do acoplamento entre a respiração e a síntese de ATP. É calculada como a diferença entre a taxa máxima de respiração (E) e a taxa de respiração LEAK (L), dividida pela taxa máxima de respiração (E). Quando não há acoplamento ( $L=E$ ), a eficiência de acoplamento é 0. Quando o sistema está totalmente acoplado ( $L=0$ ), a eficiência de acoplamento é 1. Não houve diferença significativa entre a capacidade de acoplamento entre os grupos SHAM e TCE ( $P=0.8052$ ,  $t=0.2578$ ,  $df=6$ , Fig 2f).

### ***3.3 O trauma cranioencefálico compromete a formação e a dissipação do potencial de membrana mitocondrial***

No ensaio de potencial de membrana mitocondrial utilizando Safranin-O, o grupo SHAM foi capaz de formar  $\Delta\psi_m$  após a adição de substratos, assim como dissipar após a adição de desacoplador. No entanto, nos animais TCE, observamos formação e dissipação do  $\Delta\psi_m$  prejudicados em relação ao grupo SHAM (Fig 3).

### 3. DISCUSSÃO

O TCE é um evento neurológico com estatísticas e consequências alarmantes, afetando pessoas em todo o mundo (Langlois; Rutland-Brown; Wald, 2006). Além do dano primeiro ao tecido cerebral, o dano secundário após o TCE está associado a desequilíbrios iônicos, disfunção bioenergética e acúmulo de proteínas neurotóxicas, sendo a neuroinflamação uma característica marcante que influencia os desfechos neurológicos (Blennow et al., 2016; Loane & Byrnes, 2010). Portanto, é crucial entender fatores multidimensionais que podem influenciar a resposta neuroinflamatória microglial após o TCE. Nesse contexto, o presente estudo buscou investigar os efeitos do TCE na atividade bioenergética da microglia de camundongos. Com base nesse conceito, adaptamos um método de isolamento de microglia para estudo do metabolismo mitocondrial.

Embora haja relatos de estudos da respirometria de linhagem celular microglial na literatura (Chausse *et al.*, 2020; Nagy *et al.*, 2018), o presente trabalho inovou ao apresentar um protocolo para respirometria mitocondrial de microglia *ex vivo* em camundongos. O protocolo adotado nos permitiu investigar o consumo de O<sub>2</sub> ligado aos complexos I e II, bem como analisar a capacidade fosforilativa máxima, reserva e eficiência mitocondrial. Futuros experimentos serão realizadas para investigar a resposta microglial a diferentes substratos, assim como validar os resultados obtidos.

Uma das respostas centrais ao trauma cranioencefálico é a ativação da microglia (Kumar *et al.*, 2016; Loane; Byrnes, 2010). Na fase aguda, a microglia parece reagir migrando até o local da lesão em resposta ao ATP extracelular liberado pelo tecido danificado (Davalos *et al.*, 2005). Em humanos, a ativação microglial foi relatada 72 horas após o trauma, persistindo ativação por meses e até anos após o TCE (Engel *et al.*, 2000), o que é corroborado por modelos animais. Além disso, um dos desfechos do dano secundário após o TCE é a disfunção bioenergética cerebral (Carteri *et al.*, 2019b; Kopczynski *et al.*, 2023). No entanto, há poucos estudos em relação ao efeito do TCE na bioenergética microglial de camundongos.

Nossos resultados indicam que, 24 horas após o TCE, não foram observadas mudanças significativas na análise respirométrica da microglia quando comparadas ao grupo controle SHAM. As principais métricas avaliadas, incluindo a capacidade de reserva OxPhos, eficiência de controle da via N-NS, capacidade de reserva e eficiência fosforilativa, não apresentaram

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Visto que, 24 horas após o TCE, o fenótipo microglial predominante é o M2 (Simon *et al.*, 2017), é esperado que os parâmetros respirométricos não sejam significativamente diferentes entre os grupos. No entanto, é importante ressaltar que a amostra analisada não foi do hemisfério ipsilateral, próximo à lesão, mas sim do cérebro inteiro. Dessa maneira, ainda é necessário otimizar o protocolo de isolamento para trabalhar com regiões cerebrais ou um único hemisfério.

Outro dano secundário bem estabelecido após o TCE é o dano oxidativo causado pela formação de espécies reativas de oxigênio (Carteri *et al.*, 2019b), que através de um loop pode levar ao desequilíbrio do potencial de membrana mitocondrial. Nesse sentido, observamos que a microglia do grupo TCE, diferente dos animais SHAM, é incapaz de formar e dissipar o potencial de membrana mitocondrial após o estímulo com substratos ou um desacoplador. Dado o prejuízo na força próton-motriz, mais testes serão necessários para confirmar a hipótese de que as células estejam sintetizando menos ATP. Ademais, mais estudos serão necessários para confirmar a hipótese de que o causador desse desequilíbrio seja o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais, um dano já estabelecido após o trauma cranioencefálico (Carteri *et al.*, 2019b; Kopczynski *et al.*, 2023).

Nossos resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos metabólicos envolvidos na resposta da microglia ao TCE. Embora não tenhamos identificado alterações agudas na respirometria microglial, isso não exclui a possibilidade de que mudanças ocorram em estágios subsequentes associados ao processo de recuperação ou, alternativamente, progressão do dano tecidual. Portanto, são necessários experimentos em diferentes janelas de tempo para caracterizar completamente a resposta microglial após o TCE.

Em suma, este estudo inovou ao apresentar um protocolo de respirometria mitocondrial de microglia *ex vivo* em camundongos e mostrou que não há evidências de mudanças nos parâmetros respirométricos microgliais 24 horas após o trauma cranioencefálico. A deficiência na formação e dissipação do potencial de membrana mitocondrial microglial requer mais estudos para elucidar seu mecanismo. Dessa forma, serão realizados mais experimentos para investigar a respirometria microglial em diferentes períodos, bem como em diferentes regiões do cérebro.

## 4. FIGURAS E LEGENDAS

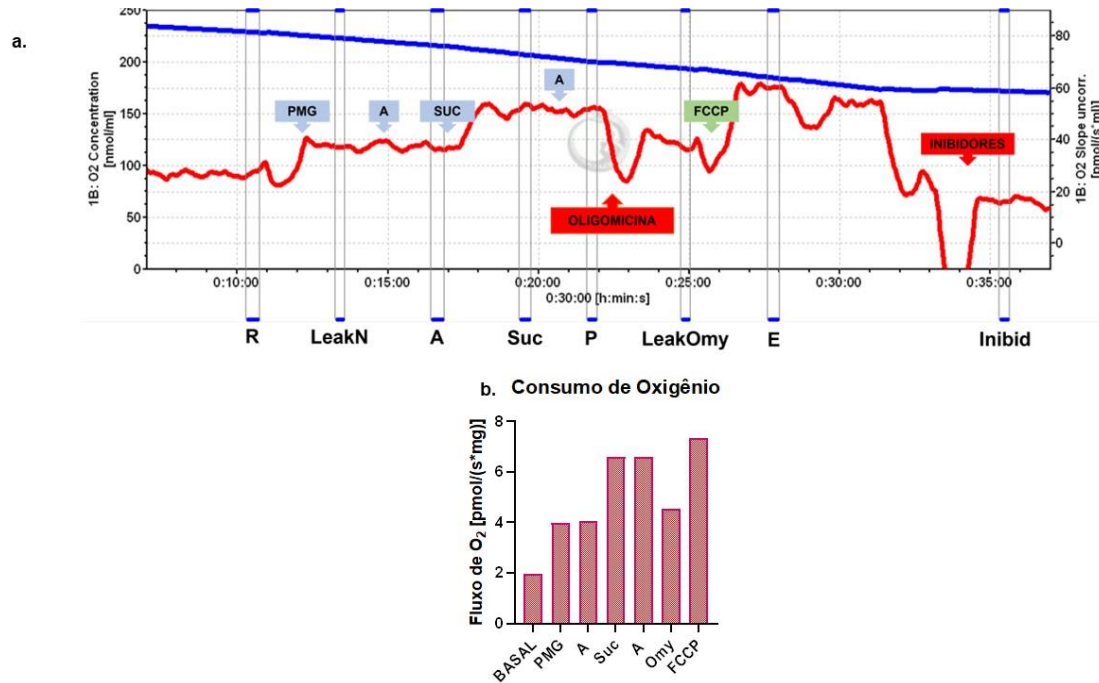


Figura 1 - Análise respirométrica mitocondrial de microglia *ex vivo* de camundongos. Foi empregado protocolo SUIT (A) utilizando substratos e inibidores do sistema de transporte de elétrons. b) Consumo de oxigênio após adição de substratos e inibidores. Abreviações: PMG, piruvato, malato e glutamato; A, ADP; SUC, succinato; FCCP, carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona; Omy, oligomicina.

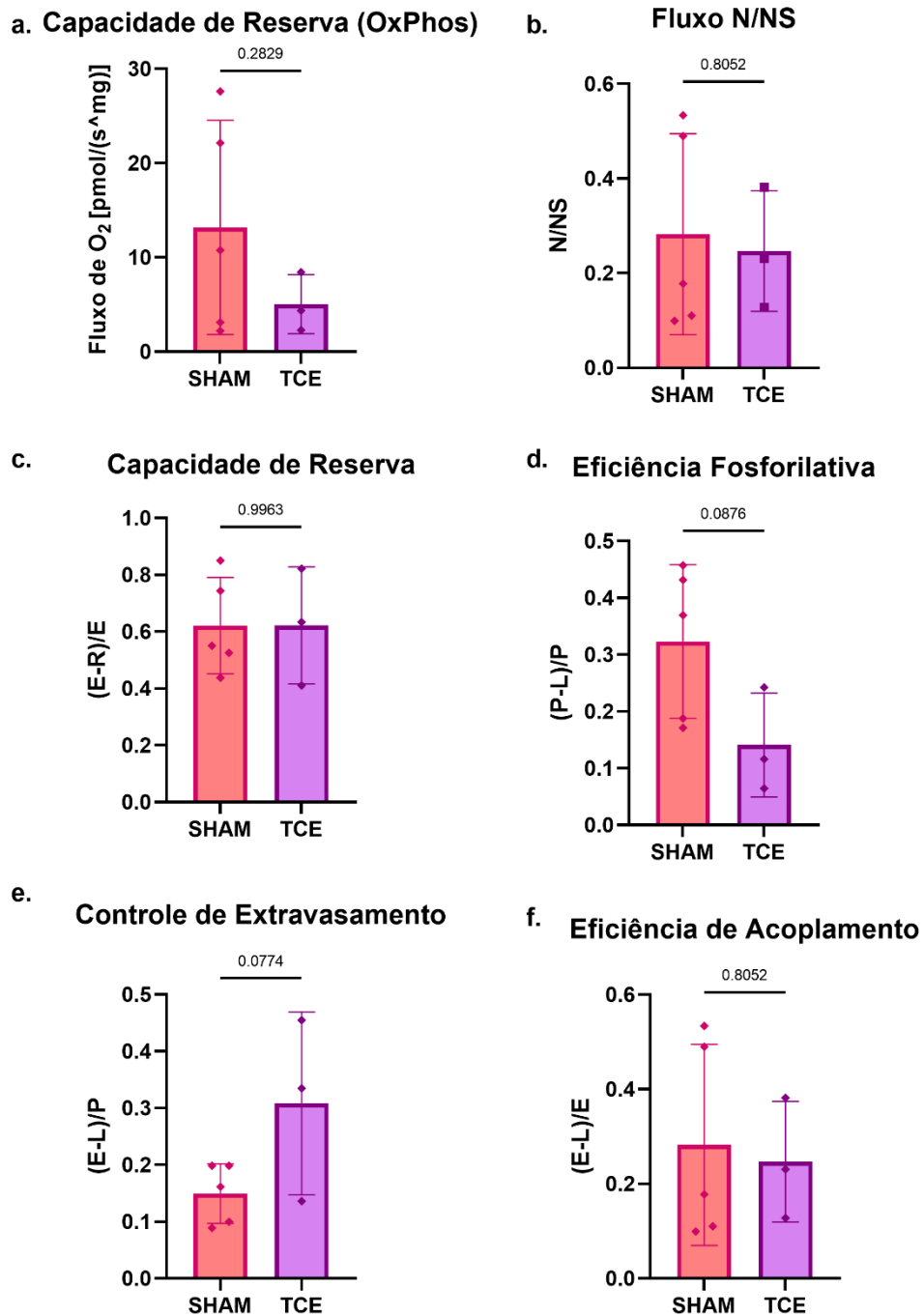


Figura 2 - Análise respirométrica mitocondrial da microglia de camundongos SHAM e TCE. Não houve diferenças significativas na capacidade de reserva OxPhos (A), fluxo N/N/S (B), capacidade de reserva (C), eficiência fosforilativa (D), controle de extravasamento (E) e eficiência de acoplamento (F) entre os grupos SHAM e TCE.

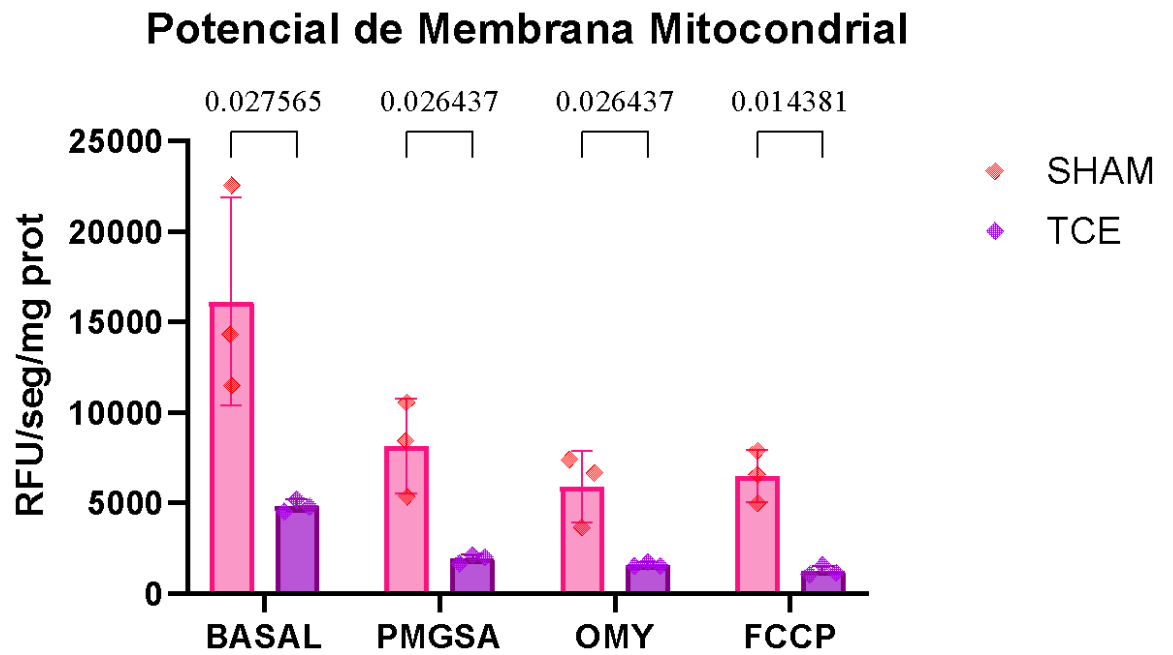


Figura 3 - Análise do potencial de membrana mitocondrial da microglia de camundongos SHAM e TCE. Após adição de substratos e desacopladores, a mitocôndria dos animais do grupo TCE não foi capaz de formar ou dissipar o potencial de membrana.



## REFERÊNCIAS

BISWAS, Subhra K.; LOPEZ-COLLAZO, Eduardo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2022.

BLENNOW, Kaj *et al.* Traumatic brain injuries. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16084, 2016. Disponível em: [www.nature.com/nrdp](http://www.nature.com/nrdp). Acesso em: 16 dez. 2020.

BLENNOW, Kaj; HARDY, John; ZETTERBERG, Henrik. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 886–899, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23217738/>. Acesso em: 6 dez. 2022.

BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A.R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and applied neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 3–18, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23252647/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

CARTERI, Randhall B. *et al.* Anabolic-androgen steroids effects on bioenergetics responsiveness of synaptic and extrasynaptic mitochondria. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 307, p. 72–80, 2019a. Disponível em: Acesso em: 7 jan. 2021.

CARTERI, Randhall B. *et al.* Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 36, n. 14, p. 2246–2259, 2019b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30794079/>. Acesso em: 2 jan. 2023.

CARTERI, Randhall Bruce Kreismann; SILVA, Ricardo Azevedo da. Traumatic brain injury hospital incidence in Brazil: an analysis of the past 10 years. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 33, n. 2, 2021.

CHAUSSE, Bruno *et al.* Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 88, p. 802–814, 2020. Disponível em: Acesso em: 13 fev. 2024.

CHENG, Gang *et al.* Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 699, 2012. Disponível em: /pmc/articles/PMC3575772/. Acesso em: 21 jan. 2024.

CHERRY, Jonathan D.; OLSCHOWKA, John A.; O'BANION, M. Kerry. Arginase 1+ microglia reduce A $\beta$  plaque deposition during IL-1 $\beta$ -dependent neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2015. Disponível em: /pmc/articles/PMC4634600/. Acesso em: 1 ago. 2023.

COLONNA, Marco; BUTOVSKY, Oleg. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 35, p. 441, 2017. Disponível em: /pmc/articles/PMC8167938/. Acesso em: 23 jul. 2023.

COLTON, Carol A.; WILCOCK, Donna M. Assessing activation states in microglia. **CNS & neurological disorders drug targets**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 174–191, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20205642/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DAMS-O'CONNOR, Kristen *et al.* Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: current knowledge and future directions. <http://dx.doi.org/10.2217/nmt-2016-0017>, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 417–429, 2016. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nmt-2016-0017>. Acesso em: 19 out. 2022.

DAVALOS, Dimitrios *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience** 2005 8:6, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 752–758, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn1472>. Acesso em: 7 fev. 2024.

ENGEL, Stefan *et al.* Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. **Acta neuropathologica**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 313–322, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10965802/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

FISCHER, Tara D. *et al.* Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 29, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2016.00029/abstract>. Acesso em: 10 jan. 2021.

GET THE FACTS ABOUT TBI. [S. l.], 2023.

GNAIGER, Erich. Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. **Bioenergetics Communications**, [s. l.], v. 2014, n. 4, p. 2–2, 2014. Disponível em: [https://www.bioenergetics-communications.org/index.php/bec/article/view/gnaiger\\_2020\\_mitopathways](https://www.bioenergetics-communications.org/index.php/bec/article/view/gnaiger_2020_mitopathways). Acesso em: 6 dez. 2022.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology** 2003 3:1, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri978>. Acesso em: 24 jul. 2023.

GUO, Shenrui; WANG, Hui; YIN, Yafu. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 14, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8888930/](https://pmc/articles/PMC8888930/). Acesso em: 24 jul. 2023.

HANISCH, Uwe Karsten; KETTENMANN, Helmut. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 10,

n. 11, p. 1387–1394, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965659/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

HEMONNOT-GIRARD, Anne-Laure *et al.* Comparative analysis of transcriptome remodeling in plaque-associated and plaque-distant microglia during amyloid- $\beta$  pathology progression in mice. **Journal of Neuroinflammation** 2022 **19:1**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–26, 2022. Disponível em: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-022-02581-0>. Acesso em: 27 set. 2022.

HERRON, Shawn *et al.* Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity. **STAR Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 101670, 2022. Disponível em: Acesso em: 2 fev. 2024.

INFANTINO, Vittoria *et al.* The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 438, n. 3, p. 433–436, 2011. Disponível em: </biochemj/article/438/3/433/45619/The-mitochondrial-citrate-carrier-a-new-player-in>. Acesso em: 22 jan. 2024.

JHA, Abhishek K. *et al.* Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 419–430, 2015. Disponível em: Acesso em: 22 jan. 2024.

JOHNSON, Victoria E. *et al.* Traumatic Brain Injury as a Trigger of Neurodegeneration. **Advances in neurobiology**, [s. l.], v. 15, p. 383–400, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28674990/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

JOHNSON, Victoria E.; STEWART, William; SMITH, Douglas H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 246, p. 35–43, 2013a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285252/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

JOHNSON, Victoria E.; STEWART, William; SMITH, Douglas H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 246, p. 35–43, 2013b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285252/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

JULIEN, J. *et al.* Association of traumatic brain injury and Alzheimer disease onset: A systematic review. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 347–356, 2017. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2022.

KOPCZYNSKI, Afonso *et al.* Lower and higher volumes of physical exercise build up brain reserves against memory deficits triggered by a head injury in mice. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 363, p. 114352, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10103909/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

KUMAR, Alok *et al.* Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 33, n. 19, p. 1732–1750, 2016. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.2015.4268>. Acesso em: 18 abr. 2023.

LANGLOIS, Jean A.; RUTLAND-BROWN, Wesley; WALD, Marlena M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **The Journal of head trauma rehabilitation**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 375–378, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16983222/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

LOANE, David J.; BYRNES, Kimberly R. Role of Microglia in Neurotrauma. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 366–377, 2010. Disponível em: Acesso em: 11 out. 2022.

LOANE, David J.; KUMAR, Alok. Microglia in the TBI Brain: The Good, The Bad, And The Dysregulated. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 275, n. 03, p. 316, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4689601/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26888881/). Acesso em: 17 out. 2022.

MICHALEK, Ryan D. *et al.* Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>. Acesso em: 22 jan. 2024.

NAGY, Adam M. *et al.* Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1859, n. 3, p. 201–214, 2018. Disponível em: Acesso em: 13 fev. 2024.

NEWSHOLME, P. *et al.* Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 121–125, 1986. Disponível em: [/biochemj/article/239/1/121/21648/Metabolism-of-glucose-glutamine-long-chain-fatty](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2711111/). Acesso em: 22 jan. 2024.

NIMMERJAHN, Axel; KIRCHHOFF, Frank; HELMCHEN, Fritjof. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831717/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

NORDSTROM, Peter *et al.* Traumatic brain injury and young onset dementia: a nationwide cohort study. **Annals of neurology**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 374–381, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24812697/>. Acesso em: 29 ago. 2023.

NORDSTRÖM, Anna; NORDSTRÖM, Peter. Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29381704/>. Acesso em: 23 jan. 2024.

O'NEILL, Luke A.J.; KISHTON, Rigel J.; RATHMELL, Jeff. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 553, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5001910/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

PALSSON-MCDERMOTT, Eva M. *et al.* Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 $\alpha$  Activity and IL-1 $\beta$  Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 65–80, 2015. Disponível em: Acesso em: 22 jan. 2024.

RODRÍGUEZ-PRADOS, Juan-Carlos *et al.* Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 605–614, 2010. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22378047/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SIMON, Dennis W. *et al.* The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. **Nature Reviews Neurology** 2017 13:3, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 171–191, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2017.13>. Acesso em: 10 out. 2022.

SMITH, Douglas H. *et al.* A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 12, n. 2, p.

169–178, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7629863/>. Acesso em: 6 dez. 2022.

STROGULSKI, Nathan R. *et al.* Fundamental Neurochemistry Review: Microglial immunometabolism in traumatic brain injury. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 129–153, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.15959>. Acesso em: 30 jan. 2024.

SUN, Xin Gang *et al.* Aerobic Glycolysis Induced by mTOR/HIF-1 $\alpha$  Promotes Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage via Activating M1 Microglia. **Translational stroke research**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36385451/>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SURVEILLANCE REPORT OF TRAUMATIC BRAIN INJURY-RELATED EMERGENCY DEPARTMENT VISITS, HOSPITALIZATIONS, AND DEATHS. . [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: [www.cdc.gov/TraumaticBrainInjury](http://www.cdc.gov/TraumaticBrainInjury). Acesso em: 30 jan. 2024.

TANNAHILL, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . **Nature** **2013 496:7444**, [s. l.], v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11986>. Acesso em: 22 jan. 2024.

TURTZO, L. Christine *et al.* Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-82>. Acesso em: 19 out. 2022.



VOSS, Kelsey *et al.* A guide to interrogating immunometabolism. **Nature Reviews Immunology** 2021 21:10, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 637–652, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00529-8>. Acesso em: 29 out. 2023.

XU, Xiao Jian *et al.* Glucose metabolism: A link between traumatic brain injury and Alzheimer's disease. **Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 5–10, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33358332/>. Acesso em: 8 set. 2022.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo introduziu um novo protocolo de respirometria de microglia *ex vivo* de camundongos, assim como avaliou os efeitos de um trauma cranioencefálico severo nesses animais. Na janela de tempo observada (24 horas), não foram identificados efeitos significativos do TCE nos parâmetros de capacidade de reserva, fluxo N/NS, eficiência fosforilativa, controle de extravasamento e eficiência de acoplamento mitocondriais. Entretanto, as mitocôndrias da microglia dos animais submetidos ao TCE demonstraram incapacidade de formar e dissipar potencial de membrana, ao contrário das dos animais SHAM. Dessa forma, este estudo conclui que, em 24 horas, não há efeito do TCE nos parâmetros respirométricos mitocondriais da microglia de camundongos.

Em experimentos futuros, serão analisados marcadores de inflamação, como interleucinas pró- e anti-inflamatórias, além das proteínas-chave da via glicolítica, para caracterização do fenótipo microglial. Experimentos serão conduzidos em diferentes períodos de recuperação após o trauma cranioencefálico, assim como em diferentes graus de severidade do TCE. Experimentos de imuno-histoquímica serão efetuados para caracterizar a morfologia microglial em resposta ao TCE. Testes comportamentais e cognitivos serão realizados para avaliar a associação entre o comprometimento bioenergético da microglia e os danos cognitivos resultantes do TCE. Por fim, o artigo será reescrito para submissão ao periódico *Journal of Neurochemistry*.

## REFERÊNCIAS

- BISWAS, Subhra K.; LOPEZ-COLLAZO, Eduardo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2022.
- BLENNOW, Kaj *et al.* Traumatic brain injuries. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16084, 2016. Disponível em: [www.nature.com/nrdp](http://www.nature.com/nrdp). Acesso em: 16 dez. 2020.
- BLENNOW, Kaj; HARDY, John; ZETTERBERG, Henrik. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 886–899, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23217738/>. Acesso em: 6 dez. 2022.
- BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A.R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and applied neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 3–18, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23252647/>. Acesso em: 24 jul. 2023.
- CARTERI, Randhall B. *et al.* Anabolic-androgen steroids effects on bioenergetics responsiveness of synaptic and extrasynaptic mitochondria. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 307, p. 72–80, 2019a. Disponível em: Acesso em: 7 jan. 2021.
- CARTERI, Randhall B. *et al.* Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 36, n. 14, p. 2246–2259, 2019b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30794079/>. Acesso em: 2 jan. 2023.
- CARTERI, Randhall Bruce Kreismann; SILVA, Ricardo Azevedo da. Traumatic brain injury hospital incidence in Brazil: an analysis of the past 10 years. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 33, n. 2, 2021.
- CHAUSSE, Bruno *et al.* Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 88, p. 802–814, 2020. Disponível em: Acesso em: 13 fev. 2024.
- CHENG, Gang *et al.* Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 699, 2012. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3575772/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23252647/). Acesso em: 21 jan. 2024.
- CHERRY, Jonathan D.; OLSCHOWKA, John A.; O'BANION, M. Kerry. Arginase 1+ microglia reduce A $\beta$  plaque deposition during IL-1 $\beta$ -dependent neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4634600/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23252647/). Acesso em: 1 ago. 2023.
- COLONNA, Marco; BUTOVSKY, Oleg. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 35, p. 441, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8167938/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23252647/). Acesso em: 23 jul. 2023.

COLTON, Carol A.; WILCOCK, Donna M. Assessing activation states in microglia. **CNS & neurological disorders drug targets**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 174–191, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20205642/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DAMS-O’CONNOR, Kristen *et al.* Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer’s disease: current knowledge and future directions. <http://dx.doi.org/10.2217/nmt-2016-0017>, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 417–429, 2016. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nmt-2016-0017>. Acesso em: 19 out. 2022.

DAVALOS, Dimitrios *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience** 2005 8:6, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 752–758, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn1472>. Acesso em: 7 fev. 2024.

ENGEL, Stefan *et al.* Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. **Acta neuropathologica**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 313–322, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10965802/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

FISCHER, Tara D. *et al.* Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 29, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2016.00029/abstract>. Acesso em: 10 jan. 2021.

GET THE FACTS ABOUT TBI. [S. l.], 2023.

GNAIGER, Erich. Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. **Bioenergetics Communications**, [s. l.], v. 2014, n. 4, p. 2–2, 2014. Disponível em: [https://www.bioenergetics-communications.org/index.php/bec/article/view/gnaiger\\_2020\\_mitopathways](https://www.bioenergetics-communications.org/index.php/bec/article/view/gnaiger_2020_mitopathways). Acesso em: 6 dez. 2022.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology** 2003 3:1, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri978>. Acesso em: 24 jul. 2023.

GUO, Shenrui; WANG, Hui; YIN, Yafu. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 14, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8888930/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

HANISCH, Uwe Karsten; KETTENMANN, Helmut. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1387–1394, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965659/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

HEMONNOT-GIRARD, Anne-Laure *et al.* Comparative analysis of transcriptome remodeling in plaque-associated and plaque-distant microglia during amyloid- $\beta$  pathology progression in mice. **Journal of Neuroinflammation** 2022 19:1, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–26, 2022. Disponível em: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-022-02581-0>. Acesso em: 27 set. 2022.

HERRON, Shawn *et al.* Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity. **STAR Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 101670, 2022. Disponível em: Acesso em: 2 fev. 2024.

INFANTINO, Vittoria *et al.* The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 438, n. 3, p. 433–436, 2011. Disponível em: </biochemj/article/438/3/433/45619/The-mitochondrial-citrate-carrier-a-new-player-in>. Acesso em: 22 jan. 2024.

JHA, Abhishek K. *et al.* Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 419–430, 2015. Disponível em: Acesso em: 22 jan. 2024.

JOHNSON, Victoria E. *et al.* Traumatic Brain Injury as a Trigger of Neurodegeneration. **Advances in neurobiology**, [s. l.], v. 15, p. 383–400, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28674990/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

JOHNSON, Victoria E.; STEWART, William; SMITH, Douglas H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 246, p. 35–43, 2013a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285252/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

JOHNSON, Victoria E.; STEWART, William; SMITH, Douglas H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 246, p. 35–43, 2013b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22285252/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

JULIEN, J. *et al.* Association of traumatic brain injury and Alzheimer disease onset: A systematic review. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 347–356, 2017. Disponível em: Acesso em: 19 out. 2022.

KOPCZYNSKI, Afonso *et al.* Lower and higher volumes of physical exercise build up brain reserves against memory deficits triggered by a head injury in mice. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 363, p. 114352, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10103909/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

KUMAR, Alok *et al.* Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 33, n. 19, p. 1732–1750, 2016. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.2015.4268>. Acesso em: 18 abr. 2023.

LANGLOIS, Jean A.; RUTLAND-BROWN, Wesley; WALD, Marlena M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **The Journal of head trauma rehabilitation**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 375–378, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16983222/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

LOANE, David J.; BYRNES, Kimberly R. Role of Microglia in Neurotrauma. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 366–377, 2010. Disponível em: Acesso em: 11 out. 2022.

LOANE, David J.; KUMAR, Alok. Microglia in the TBI Brain: The Good, The Bad, And The Dysregulated. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 275, n. 0 3, p. 316, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4689601/>. Acesso em: 17 out. 2022.

MICHALEK, Ryan D. *et al.* Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4+ T Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 2011. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>. Acesso em: 22 jan. 2024.

NAGY, Adam M. *et al.* Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1859, n. 3, p. 201–214, 2018. Disponível em: Acesso em: 13 fev. 2024.

NEWSHOLME, P. *et al.* Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 121–125, 1986. Disponível em: /biochemj/article/239/1/121/21648/Metabolism-of-glucose-glutamine-long-chain-fatty. Acesso em: 22 jan. 2024.

NIMMERJAHN, Axel; KIRCHHOFF, Frank; HELMCHEN, Fritjof. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15831717/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

NORDSTROM, Peter *et al.* Traumatic brain injury and young onset dementia: a nationwide cohort study. **Annals of neurology**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 374–381, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24812697/>. Acesso em: 29 ago. 2023.

NORDSTRÖM, Anna; NORDSTRÖM, Peter. Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29381704/>. Acesso em: 23 jan. 2024.

O'NEILL, Luke A.J.; KISHTON, Rigel J.; RATHMELL, Jeff. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 553, 2016. Disponível em: /pmc/articles/PMC5001910/. Acesso em: 24 jul. 2023.

PALSSON-MCDERMOTT, Eva M. *et al.* Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 $\alpha$  Activity and IL-1 $\beta$  Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 65–80, 2015. Disponível em: Acesso em: 22 jan. 2024.

RODRÍGUEZ-PRADOS, Juan-Carlos *et al.* Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 605–614, 2010. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22378047/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SIMON, Dennis W. *et al.* The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. **Nature Reviews Neurology** 2017 13:3, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 171–191, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2017.13>. Acesso em: 10 out. 2022.

SMITH, Douglas H. *et al.* A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 169–178, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7629863/>. Acesso em: 6 dez. 2022.

STROGULSKI, Nathan R. *et al.* Fundamental Neurochemistry Review: Microglial immunometabolism in traumatic brain injury. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 129–153, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.15959>. Acesso em: 30 jan. 2024.

SUN, Xin Gang *et al.* Aerobic Glycolysis Induced by mTOR/HIF-1 $\alpha$  Promotes Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage via Activating M1 Microglia. **Translational stroke research**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36385451/>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SURVEILLANCE REPORT OF TRAUMATIC BRAIN INJURY-RELATED EMERGENCY DEPARTMENT VISITS, HOSPITALIZATIONS, AND DEATHS. . [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: [www.cdc.gov/TraumaticBrainInjury](http://www.cdc.gov/TraumaticBrainInjury). Acesso em: 30 jan. 2024.

TANNAHILL, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . **Nature** **2013 496:7444**, [s. l.], v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11986>. Acesso em: 22 jan. 2024.

TURTZO, L. Christine *et al.* Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-11-82>. Acesso em: 19 out. 2022.

VOSS, Kelsey *et al.* A guide to interrogating immunometabolism. **Nature Reviews Immunology** **2021 21:10**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 637–652, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00529-8>. Acesso em: 29 out. 2023.

XU, Xiao Jian *et al.* Glucose metabolism: A link between traumatic brain injury and Alzheimer's disease. **Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 5–10, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33358332/>. Acesso em: 8 set. 2022.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY

### Free Format Submission

#### Title Page

- Your co-author details, including affiliation and email address, laboratory of origin (i.e. where the research was conducted; current address may be added, following COPE advice), address, telephone numbers, email address of the person to whom proofs and reprint requests should be addressed, and an alphabetical list of abbreviations used in the text (see "Abbreviations & Nomenclature" section for more info).

#### Introduction

- Avoid exhaustive reviews of the literature. Provide a brief summary of the most relevant published literature, clearly stating the advances of the presented study over previous publications, including a clear statement of the hypothesis/research question and study aims.

#### Methods

- For structure and requested information, see our data reporting checklist under "Data Availability".
- Note that **all requested information must be contained in the manuscript text** proper, or else include a statement why they do not apply.
- Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*):
  - Ethics approval statement.
  - Informed patient consent statement.
  - Permission to reproduce materials from other sources, if applicable.
  - (Clinical trial) registration, as applicable.



## Results

- Describe the findings objectively, avoiding discussion of their significance.
- *Journal of Neurochemistry* requires full statistical reports for transparency of all data. This information can appear either in the results text, figure legends or as a stand-alone table of all analyses but must be captured via one of these options; the editors reserve the right to advise on the most legible format in specific cases. The statistical report should include the following:
  - Define threshold P value for significance for any statistical test that was used
  - Specify whether tests were one- or two-tailed and provide details of any corrections for multiple comparisons, as well as a justification if no corrections were applied
  - Clearly describe and justify any data normalization, including whether this results in the need for non-parametric analysis (for example the normalization process results in data lacking variance)
  - For expression / sequencing data please define software packages and parameters used for summarizing, normalizing and scaling data, including false discovery rate (FDR). Also, please state criteria for analysis of differentially expressed genes (FDR, fold change) and provide actual adjusted P values. Sample and sequencing metadata should be provided as supplementary data
  - For all data sets please provide full statistical reports (for example with ANOVA include the degrees of freedom, F value, actual P value; with a t-test include degrees of freedom, t value, actual P value)

## Discussion

- Summarize the main conclusions of the work.
- Assess the significance of the findings in relation to the status of the field.
- Discuss study limitations.

- the corresponding author to review this policy with all authors and to list ALL pertinent commercial and other relationships. For further information on what should be declared please also see the BMJ declaration and corresponding BMJ editorial - Beyond conflict of interest (*BMJ* 1998;**317**:291 - 2). The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, this must also be stated.
- Provide a Data Availability Statement (see Data Availability section for examples).

## References

- *Journal of Neurochemistry* uses APA reference style. Please note that APA references include up to 20 author names. If your reference has 21 or more than 21 authors the Journal will list the first 19 authors' names, followed by an ellipsis, and the last author's name. E.g:

Pegion, K., Kirtman, B. P., Becker, E., Collins, D. C., LaJoie, E., Burgman, R., Bell, R., DelSole, R., Min, D., Zhu, Y., Li, W., Sinsky, E., Guan, H., Gottschalck, J., Metzger, E. J., Barton, N. P., Achuthavarier, D., Marshak, J., Koster, R., ... Kim, H. (2019). The subseasonal experiment (SubX): A multimodel subseasonal prediction experiment. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 100(10), 2043– 2061.

**The Journal offers Free Format submission, so you do not need to format the style of references in your article, given all the author names are provided.** This will instead be taken care of by the typesetter.

- **Unpublished experiments, papers in preparation**, etc., may be mentioned only in the text; they must not be included in the list of References.
- **Personal communications** may be used only when written authorization from the communicator is submitted with the original manuscript; they may be mentioned only in the text, citing the name of communicator.
- Cite papers that have been **accepted for publication** in the References with the abbreviated name of the Journal followed by the words, in press. Indicate the date of acceptance of each such paper when the manuscript is submitted. If reference is

made to papers in press (or submitted), such items must be uploaded online and labelled as 'supporting document, for information'.

- Citation of **preprints**: Preprints can be cited via their DOI similar to published articles in the References list. Please refer to Wiley's Preprints Policy and Wiley's Data Citation Policy.

### Figures and Tables

- Data may be presented as **box-plots** or **scatter-plots**. **Individual datapoints should be presented as dot plots for  $n < 15$ .**
  - Specify the "n" number and define what it indicates in each figure legend.
  - Define all abbreviations upon first use in each figure legend.
  - **Scale bars** must be included in all **photomicrographs**.
  - Use the table function of a word processor rather than tabs and spaces.
  - Clearly indicate the **units of measurement** in the column headings of a Table or the coordinates of a Figure.
- There are no limits to the number of figures or tables.