



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

JANAINA RIBEIRO PEREIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTINEUROINFLAMATÓRIA DE FLAVONOIDES E
DERIVADOS DE SÍNTESE EM CÉLULAS GLIAIS**

Salvador, BA
2022

JANAINA RIBEIRO PEREIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTINEUROINFLAMATÓRIA DE FLAVONOIDES E
DERIVADOS DE SÍNTESE EM CÉLULAS GLIAIS**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Juciele Valéria Ribeiro de
Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Lima Costa

Salvador, BA
2022

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

S237 Soares, Janaina Ribeiro Pereira

Avaliação de atividade antioxidante e antineuroinflamatória de flavonoides e derivados de síntese em células gliais/Janaina Ribeiro Pereira Soares. – Salvador, 2022.

83 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juciele Valéria Ribeiro de Oliveira;

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Lima Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Radicais livres. 2. Neuroinflamação. 3. Doenças neurodegenerativas
4. Flavonoides. 5. Antioxidantes. I. Oliveira, Juciele Valéria Ribeiro de
II. Costa, Silvia Lima. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 577.27

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTINEUROINFLAMATÓRIA DE FLAVONOIDES E DERIVADOS DE SÍNTESE EM CÉLULAS GLIAIS

JANAINA RIBEIRO PEREIRA SOARES

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia,
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Salvador, 16 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Margarete Zanardo Gomes

Profª Drª Clarissa de Sampaio Schitine

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus e ao universo por ter me dado forças para chegar até aqui.

Meu muito obrigada a minha mãe Tania, por todo amor, cuidado e pela torcida nas minhas conquistas. Ao meu pai, por acreditar em mim e me fazer enxergar que a vida pode ser sempre mais leve. À vó Alice, como é bom ter seu carinho e apoio, voinha.

Aos meus avós (*in memoriam*): Zenaide e João, como dói a saudade. Sei que estão aí de cima felizes por mais uma conquista da neta de vocês e torcendo sempre por mim.

Às minhas irmãs: Anna, Aline e Sara. Eu sou a pessoa mais feliz do mundo por ter vocês como irmãs. Sempre que a gente se junta, é uma alegria sem fim. Tenham certeza de que esses momentos foram cruciais para que essa caminhada fosse mais leve.

Aos meus sobrinhos: Manu e Kauã, as crianças mais especiais da minha vida. Vocês são o meu coração fora do corpo. Me fizeram enxergar o mundo com a alegria e a curiosidade de uma criança.

Ao meu amor Marcus, desde lá, quando eu estudava loucamente para passar no vestibular (na época que a UFBA ainda tinha duas fases, rs), você sempre me incentivou com palavras de carinho e apoio. Obrigada pela sua amizade, amor e paciência. Aos meus sogros, sempre presentes, vocês são minha segunda família, sou eternamente grata por ter vocês na minha vida.

À toda minha família por todo apoio necessário e pelo incentivo. Sem esquecer da minha pet Pretinha, que faz minha vida mais alegre e divertida, por seu amor e companhia nas muitas noites enquanto eu estudava.

Às minhas amigas e parceiras de vida: Juliana, Jurema, Renata, Isabela, Melina, Laís e Lua. Vocês são minhas irmãs de coração. Obrigada por tudo!

À minha psi Tati, obrigada por me fazer mergulhar em mim mesma nessa louca jornada do autoconhecimento.

À professora Sílvia, meu exemplo de cientista, de força e conhecimento. Obrigada pela confiança e por ter me acolhido lá em 2014, dando uma chance para aquela menina apaixonada pelo mundo da Neurociência, que sonhava em fazer pesquisa. Que honra poder ter sido a sua aluna, minha eterna gratidão, pró Sílvia, por tudo que fez por mim. À professora Juciele, meu muito obrigada pela confiança de me acolher como sua aluna de mestrado, uma grande honra. Obrigada professoras por terem me orientado, pela disponibilidade e atenção literalmente em todas as horas. Obrigada por terem me ensinado a fazer pesquisa de excelência.

Aos professores: Prof.^a Dr^a Maria de Fátima, Prof. Dr. Victor Diógenes, Prof.^a Dr^a Ravena Nascimento, Prof. Dr. Maurício Victor e Prof.^a Dr^a Clarissa

Schitine. Obrigada por terem contribuído com a minha jornada na pesquisa e por toda sabedoria a mim passada. Minha eterna gratidão!

À Prof^a Dr^a Margarete Zanardo e Prof. Dr. Denis de Melo pelas contribuições dadas na minha banca de qualificação para melhorar a qualidade deste trabalho.

Aos meus primeiros tutores de quando entrei no lab lá em 2014. Se hoje cheguei até aqui, foi porque tive pessoas especiais como vocês no início da minha jornada na pesquisa: Alê, Paulo e Érica Patrícia, obrigada por todo conhecimento a mim passado.

Aos meus amigos e colegas da família LabNq. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio, pelas palavras de conforto, pelas ligações, pelos abraços, pelos sorrisos, pelos experimentos! Meu muito obrigada a cada um de vocês: Luã, Érica, Moni, Cléo, Jeu, Áurea, Rafa, Kari, Lana, Beto, Felipe, Markley, Ana Elisa, Wash, Cath, Cinthia, Livoka, Vera, Deivi, Brenda, Balbs e Lúcia. Quando a gente se juntava, era sempre uma festa. Se eu estivesse preocupada com alguma coisa ou passando o maior perrengue no lab, ter vocês no meu dia fazia tudo ficar mais leve. Sou eternamente grata por ter conhecido tanta gente boa na pesquisa. Obrigada pela amizade, vocês são incríveis! A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, meu muito obrigada!

Aos meninos de ouro do LBBB, Valdir e Diego, obrigada por todo apoio, bondade e pelos ensinamentos das técnicas ainda desconhecidas por mim.

Às meninas da secretaria: Aline e Juci. Obrigada pela paciência e pelo carinho.

E por fim, aos órgãos de fomento FAPESB, CAPES e CNPq, ao ICS-UFBA e LabNq pela estrutura e suporte para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Aos meus sobrinhos, Manu e Kauã.

RESUMO

Os astrócitos participam ativamente da regulação redox no cérebro. O desequilíbrio entre a superprodução de espécies reativas e mecanismos antioxidantes, pode resultar na astrogliose reativa. A astrogliose associada ao estresse oxidativo, pode promover mudanças na morfologia e na função celular, redução da atividade enzimática e aumento de citocinas e mediadores inflamatórios. Nesse contexto, os flavonoides, que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, são candidatos promissores para o estudo de terapias adjuvantes em doenças que tem como fisiopatologia o estresse oxidativo. Este trabalho avaliou, *in vitro*, a citotoxicidade e atividade antioxidante de flavonoides e derivados de síntese (naringenina, (S) – naringenina, 7,4'-O-diprenilnaringenina, (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina, 7-O-prenilnaringenina, naringina, hesperidina, crisina, apigenina e rhoifolina), associados ao controle da resposta inflamatória glial. A atividade antioxidante celular dos flavonoides e derivados de síntese (1, 10 e 50 μ M) foi determinada pela reação de eliminação do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Hesperidina e o derivado diprenilado (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina, apresentaram maiores potenciais antioxidantes e naringenina e seus demais derivados prenilados apresentaram atividade antioxidante moderada após este teste livre de células em reação de 15min. Foram utilizadas culturas primárias de glia enriquecidas de astrócitos derivadas de ratos *Wistar* neonatos (P0-P2) expostas ao lipopolissacarídeo (LPS, 1 μ g/mL por 24 h) e tratadas com as moléculas (5 ou 10 μ M por 24 h). Observou-se efeito antioxidante através do aumento dos níveis de GSH, promovidos pela naringenina e seus derivados, através do teste de depleção da glutathiona com o monoclorobimano após tratamentos (5 μ M por 24 h). Nos níveis enzimáticos de SOD, LPS e crisina aumentaram SOD e demais moléculas não interferiram nos níveis enzimáticos. Através do teste de citotoxicidade (MTT) foi demonstrado que o derivado prenilado 7-O-prenilnaringenina (1, 10 e 50 e 100 μ M por 24 h) foi o mais citotóxico para as células proliferativas de GL15 (humana) e C6 (murino), no entanto sem apresentar toxicidade e mudanças morfológicas para as células da cultura primária de glia enriquecida de astrócitos. Na coloração de Rosenfeld, apigenina e crisina (10 μ M por 24 h), induziram mudanças morfológicas como retração do citoplasma e núcleo das células da cultura primária de glia enriquecida de astrócitos e demais moléculas atenuaram mudanças morfológicas promovidas pelo LPS (1 μ g/mL) quando em tratamento concomitante. Além disso, os flavonoides e derivados de síntese (10 μ M, 24 h) promoveram redução dos níveis de óxido nítrico (NO) e não induziram produção de NO em tratamento isolado. Juntos, esses achados indicam que flavonoides e derivados de síntese têm capacidade antioxidante e antineuroinflamatória significativas, *in vitro*, podendo ser aliados como candidatos a tratamentos adjuvantes em doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Radicais Livres. Neuroinflamação. Flavonoides. Doenças neurodegenerativas. Antioxidantes.

ABSTRACT

Astrocytes actively participate in redox regulation in the brain. The imbalance between overproduction of reactive species and antioxidant mechanisms can result in reactive astrogliosis. Astrogliosis associated with oxidative stress can promote changes in cell morphology and function, reduced enzymatic activity and increased cytokines and inflammatory mediators. In this context, flavonoids, which have antioxidant and anti-inflammatory properties, are promising candidates for the study of adjuvant therapies in diseases whose pathophysiology is oxidative stress. This work evaluated, *in vitro*, the cytotoxicity and antioxidant activity of flavonoids and synthetic derivatives (naringenin, (S) – naringenin, 7,4'-O-diprenylnaringenin, (S)-7,4'-O-diprenylnaringenin, 7-O-prenylnaringenin, naringin, hesperidin, chrysin, apigenin and rhoifolin), associated with the control of the glial inflammatory response. The cellular antioxidant activity of flavonoids and synthesis derivatives (1, 10 and 50 μ M) was determined by the free radical scavenging reaction 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). Hesperidin and the diprenylated derivative (S)-7,4'-O-diprenylnaringenin showed higher potential antioxidants and naringenin and its other prenylated derivatives showed moderate antioxidant activity after this cell-free test in a 15min reaction. Primary cultures of astrocyte-enriched glia derived from neonatal Wistar rats (P0-P2) exposed to lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL for 24 h) and treated with the molecules (5 or 10 μ M for 24 h) were used. An antioxidant effect was observed through the increase in GSH levels, promoted by naringenin and its derivatives, through the glutathione depletion test with monochlorobimane after treatments (5 μ M for 24 h). The enzymatic levels of SOD, LPS and chrysin increased SOD and other molecules did not interfere with enzymatic levels. Through the cytotoxicity test (MTT) it was demonstrated that the prenylated derivative 7-O-prenylnaringenin (1, 10 and 50 and 100 μ M for 24 h) was the most cytotoxic for the proliferative cells of GL15 (human) and C6 (murine), however, without presenting toxicity and morphological changes for primary culture cells of astrocyte-enriched glia. In Rosenfeld staining, apigenin and chrysin (10 μ M for 24 h) induced morphological changes such as retraction of the cytoplasm and nucleus of cells from primary culture of astrocyte-enriched glia and other molecules attenuated morphological changes promoted by LPS (1 μ g/mL) when on concomitant treatment. In addition, flavonoids and synthetic derivatives (10 μ M, 24 h) promoted a reduction in nitric oxide (NO) levels and did not induce NO production in isolated treatment. Together, these findings indicate that flavonoids and synthesis derivatives have significant antioxidant and antineuroinflammatory capacity, *in vitro*, and may be allied as candidates for adjuvant treatments in neurodegenerative diseases.

Keywords: Free Radicals. Neuroinflammation. Flavonoids. Neurodegenerative diseases. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química dos flavonoides | 23 |
| Figura 2 - Diversidade dos flavonoides | 24 |
| Figura 3 - Estrutura da 7-O-Prenilnaringenina..... | 26 |
| Figura 4 - Estrutura química de flavonoides de naringenina e seus derivados prenilados e de flavonoides crisina, apigenina, naringina, rhoifolina e hesperidina..... | 29 |
| Figura 5 - Delineamento experimental de ensaio de MTT..... | 33 |
| Figura 6 - Atividade antioxidante das flavanonas e flavonas na eliminação do radical DPPH ao longo de 15 minutos..... | 37 |
| Figura 7 - Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em células astrocitárias humanas da linhagem GL-15..... | 39 |
| Figura 8 - Fotomicrografia de células astrocitárias humanas da linhagem GL-15 após tratamentos..... | 40 |
| Figura 9 - Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em células astrocitárias murinas da linhagem C6..... | 41 |
| Figura 10 - Fotomicrografia de células astrocitárias murinas da linhagem C6 após tratamentos..... | 42 |
| Figura 11 – Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em culturas primárias de células glias enriquecida de astrócitos..... | 43 |
| Figura 12 - Fotomicrografia de células em culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos..... | 44 |
| Figura 13 - Efeito dos flavonoides e derivados de síntese em culturas primárias de glia enriquecida de astrócitos na depleção da glutathiona após tratamentos. (A) Fotomicrografia de marcação por fluorescência. (B) Intensidade de fluorescência dos níveis de glutathiona..... | 47 |
| Figura 14 - Atividade total de superóxido dismutase (SOD) em cultura primária de glia enriquecida de astrócitos após tratamentos..... | 49 |
| Figura 15 - Níveis de nitrito, forma estável de óxido nítrico (NO) determinados pela reação de Griess no sobrenadante de culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos..... | 51 |
| Figura 16 - Fotomicrografias evidenciando a morfologia de células após coloração de Rosenfeld em culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg - L-arginina

ATP – Adenosina Trifosfato

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE - Barreira Hematoencefálica

°C – Grau celsius

C6 - Linhagem de glioma murino C6

CAT - Catalase

Cu - Cobre

DAMP - Padrões Moleculares Associados a Danos

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DMF - Dimetilformamida

eNOS - NOS endotelial

ER's- Espécies Reativas

ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO's - Espécies Reativas De Oxigênio

GFAP - Proteína Fibrilar Ácida Glial (Glial Fibrillary Acidic Protein)

GPx - Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

H₂O₂ - Peróxido De Hidrogênio

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

iNOS - NOS Induzível

LPS - Lipopolissacarídeo

MCB - Monoclorobimano

MDA - Malondialdeído

mRNA - RNA Mensageiro

mtNOS - NOS Mitocondrial

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

NF - κ B - Factor nuclear kappa B

NGF - Fator De Crescimento Nervoso

nNOS - NOS neuronal

NO - Óxido Nítrico

NOS2 - Óxido Nítrico Sintase 2

NRF2 - Fator nuclear derivado de eritroide 2

$O_2^{\bullet-}$ - Radical Superóxido

OH^{\bullet} - Radical Hidroxila

$OONO^-$ - Peroxinitrito

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PDGF - Fator De Crescimento Derivado De Plaquetas

RNM - Ressonância Magnética Nuclear

RT- qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição reversa

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

STAT 2 - Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 2

TGF β - Fator de Crescimento Transformante Beta

TLR4 - Receptor toll-like 4

TNF - Fator de Necrose Tumoral

μ M – Micromolar

μ M - Microlitro

γ -GCS - γ -Glutamilcisteína sintetase

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1. ESPÉCIES REATIVAS E MECANISMOS ANTIOXIDANTES CELULARES | 16 |
| 2.2. ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS . | 18 |
| 2.2.1 Flavonoides: Promissores adjuvantes terapêuticos | 22 |
| 3. HIPÓTESE | 27 |
| 4. OBJETIVOS | 27 |
| 4.1. Objetivo geral | 27 |
| 4.2. Objetivos específicos | 27 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| Aspectos éticos..... | 28 |
| 5.1. Obtenção das moléculas e diluições..... | 28 |
| 5.2. Teste do DPPH (<i>cell-free</i> teste) | 29 |
| 5.3. Cultura de linhagens celulares astrocitárias C6 e GL-15 e tratamentos | 30 |
| 5.4. Cultura primária de glia enriquecida de astrócitos e tratamentos | 31 |
| 5.5. Teste do MTT..... | 32 |
| 5.6. Avaliação da glutathione (GSH) | 33 |
| 5.7. Avaliação de atividade de superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) | 33 |
| 5.8. Dosagem de Óxido Nítrico | 34 |
| 5.9. Coloração de Rosenfeld | 35 |
| 5.10. Análise Estatística..... | 35 |
| 6. RESULTADOS | 37 |
| 6.1. Capacidade antioxidante (<i>cell-free</i> teste): flavonoides e derivados de síntese apresentam diferentes atividade antioxidante frente ao radical DPPH | 37 |
| 6.2. Flavonoides e derivados de síntese apresentam diferentes efeitos na viabilidade de células astrocitárias | 39 |
| 6.3. Flavonoides e derivados de síntese são capazes de modular a reatividade astrocitária e sistemas antioxidantes | 47 |
| 6.3.1 O flavonoide naringenina e derivados prenilados modulam os níveis de GSH | 47 |
| 6.3.2 LPS e crisina promovem aumento dos níveis da superóxido dismutase. | 49 |
| 6.3.3 Flavonoides e derivados modulam diferencialmente a produção de Oxido Nítrico | 51 |
| 6.3.4 Flavonoides e derivados modulam diferencialmente a morfologia de células da glia em culturas de glia enriquecidas de astrócitos.... | 52 |
| 7. DISCUSSÃO | 54 |
| 8. CONCLUSÃO | 62 |
| 9. REFERÊNCIAS | 64 |
| 10. ANEXOS | |

INTRODUÇÃO

As espécies reativas, uma vez que são subprodutos do metabolismo celular, estão envolvidas em processos imunológicos, de sinalização sináptica e memória (ADAM-VIZI, 2005; MORGAN & LIU, 2011, HARDINGHAM, DACHTLER & FOX, 2013). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e mecanismos antioxidantes como enzimas e moléculas de baixo peso molecular como a GSH (MCCORD & FRIDOVIC, 1969; KIM *et al.*, 2015; FORMAN, ZHANG & RINNA, 2009) leva a diversas alterações como o estresse oxidativo no encéfalo (HSIEH & YANG, 2013).

Dentre as células da glia, os astrócitos são as principais células homeostáticas no cérebro e estão relacionadas às respostas inflamatórias e a imunidade inata do sistema nervoso central (FARINA, ALOISI & MEINL, 2007). A astrogliose reativa é uma resposta clássica dos astrócitos a lesões cerebrais, doenças e insultos, como um mecanismo resolutivo da lesão. Porém de forma persistente, está associada a distúrbios como as doenças neurodegenerativas que tem como uma das fisiopatologias o estresse oxidativo e a neuroinflamação (SOFRONIEW *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2019). Esta condição de astrogliose pode induzir o aumento de mediadores inflamatórios através da secreção de citocinas e quimiocinas levando a formação de cicatriz glial que delimita o local da lesão, reduzindo os desequilíbrios na homeostase tecidual, restringindo a inflamação (MURPHY, 2000; REIS *et al.*, 2017; NELSON, CONNOLLY & MCARTHUR, 2003).

Neste contexto, os astrócitos possuem atividade ambivalente exibindo fenótipo protetor ou prejudicial durante a neuroinflamação. Estudos *in vitro* demonstraram que fatores como o NFkB, que amplifica a produção sustentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, através do aumento da expressão de enzimas pró-inflamatórias, induziu a produção de agentes neurotóxicos por diferentes tipos de células, como microglia e astrócitos, levando indiretamente à apoptose neuronal (CHEN *et al.*, 2005; FISCHER & MAIER, 2015; SINGH *et al.*, 2020). Em contrapartida, a inativação do NFkB, em astrócitos, melhorou a degeneração axonal no giro dentado, reduzindo a infiltração de leucócitos via STAT2 e neuroinflamação (KHOROOSHI, BABCOCK & OWENS, 2008).

Atualmente, as doenças neurodegenerativas não têm cura. Os medicamentos atuam de forma mais eficaz em estágios iniciais da doença, podendo atenuar a progressão do distúrbio e o declínio cognitivo, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, entretanto, estas drogas utilizadas promovem altas toxicidades e efeitos colaterais.

Substâncias naturais como os polifenóis dietéticos, os flavonoides, são compostos presentes em plantas (RICE-EVANS *et al.*, 1995) e apresentam diversas propriedades farmacológicas como atividade antitumoral (DA SILVA *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2021), imunomoduladora (DOURADO *et al.*, 2020) e morfogênica (SILVA *et al.*, 2008). Muitos flavonoides dentre estes a flavanona naringenina (CHTOUROU *et al.*, 2016) e flavona apigenina (AHMEDY *et al.*, 2022) têm sido alvo de estudos devido aos seus potenciais benefícios para a saúde humana principalmente na prevenção de distúrbios neuroinflamatórios e do declínio cognitivo associado a condições patológicas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, neutralizando ou retardando a progressão dessas doenças (CARUSO *et al.*, 2022; GODOS *et al.*, 2020). Flavonoides também são neuroprotetores (OLIVEIRA-JUNIOR *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2021) através de alguns mecanismos como a capacidade de diminuir os níveis de mediadores pró-oxidantes e pró-inflamatórios como o malondialdeído (MDA) além de resgatar níveis de antioxidantes cerebrais como a glutathiona reduzida (GSH) (DI PIETRO *et al.*, 2020).

Os flavonoides também podem se combinar com outras moléculas na formação de compostos prenilados (SANTOS & SILVA, 2020). Os flavonoides prenilados são uma subclasse de flavonoides, que combinam um esqueleto flavonoide com uma cadeia lateral prenil. Apesar dos flavonoides serem abundantes na natureza, os flavonoides prenilados tem disponibilidade limitada e por isso a síntese orgânica é uma excelente forma de obtenção destas moléculas. O grupo prenil confere o aumento da lipofilicidade dos flavonoides, levando a uma maior permeabilidade e biodisponibilidade *in vivo* resultando em melhor interação com células alvo (YU *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2017). Poucos estudos descrevem as atividades antioxidantes dos flavonoides prenilados, principalmente os obtidos por síntese orgânica, demonstrando uma escassez de informações, tornando necessário o aprofundamento desta temática.

Neste contexto, estes achados impulsionam a busca por novos compostos naturais e derivados prenilados com propriedades terapêuticas, no âmbito de gerar resultados que beneficiem compreender o envolvimento das células da glia no contexto neuroinflamatório, constituindo uma estratégia futura para atenuar a progressão das doenças com cunho neuroinflamatório. Assim, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório de flavonoides e derivados de síntese prenilados frente a estímulo inflamatório em células astrocitárias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

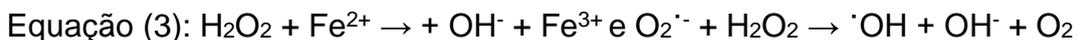
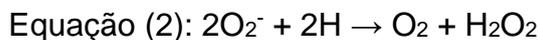
2.1 ESPÉCIES REATIVAS E MECANISMOS ANTIOXIDANTES CELULARES

Espécies reativas (ER's) é um termo que caracteriza moléculas, átomos ou íons que apresentam alta instabilidade, reatividade e conseqüentemente atividade oxidante (LOBO *et al.*, 2010). Essas espécies, principalmente de nitrogênio (ERN) e oxigênio (ERO's) são subprodutos do metabolismo celular e estão envolvidas na transdução de sinal de processos imunológicos e inflamatórios (MORGAN & LIU, 2011), na sinalização de cálcio (GÖRLACH *et al.*, 2015; PARPURA *et al.*, 1994) e em mudanças funcionais e estruturais necessárias para a plasticidade sináptica e memória (MASSAAD & KLANN, 2011; HARDINGHAM, DACHTLER & FOX, 2013).

A formação dessas moléculas acontece de forma contínua e fisiológica dentro da célula como consequência de reações enzimáticas (cadeia respiratória, fagocitose, sistema citocromo P450, dentre outros) e não enzimáticas (reações do oxigênio com compostos orgânicos) (LOBO *et al.*, 2010). Neste processo, o aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial, produção de espécies reativas nos peroxissomos e no retículo endoplasmático, pode desencadear sua liberação para o citosol, gerando lesões e oxidação de macromoléculas como o DNA, lipídios e proteínas (HE *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2015).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é uma das primeiras espécies reativas a serem formadas. Gerado majoritariamente na fosforilação oxidativa (MASSAAD & KLANN, 2011), através de um intermediário radicalar semiquinona que pode ser oxidado (equação 1) (RIBEIRO *et al.*, 2005), forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (equação 2) a partir da reação de dismutação do ânion superóxido (equação 2) (LOSADA-BARREIRO & BRAVO-DIAZ, 2017). A interação de proteínas como a transferrina e o peróxido de hidrogênio, na Reação de Fenton (equação 3) é tida como a principal via de geração do radical hidroxila (OH^{\bullet}) que é altamente reativo, através da decomposição do H_2O_2 catalisada por biometais redox-ativos como o ferro na sua forma livre (BARDESTANI *et al.*, 2021; CAROCCI *et al.*, 2018; NANDI *et al.*, 2019). Já o óxido nítrico (NO), molécula sinalizadora, é formado principalmente através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) através da conversão do aminoácido L-arginina (Arg) em L-Citrulina (equação 4). A sua

forma livre ($\text{NO}\cdot$) é prejudicial para as biomoléculas (BOURGOGNON *et al.*, 2021; POON *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2019; TEWARI *et al.*, 2021), uma vez que forma peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), envolvido na neuroinflamação (JUSTO & SUEMOTO, 2022)



Essas espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e óxido nítrico (NO) podem ser atenuados a partir de mecanismos de defesa enzimáticos ou através de pequenas moléculas antioxidantes. Estes mecanismos se baseiam em reações de clivagem e remoção dos radicais livres, convertendo-os em produtos menos tóxicos, como peróxido de hidrogênio e água através de catalisadores como: manganês, ferro, cobre e zinco. O sistema de defesa antioxidante enzimático, envolve a: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx's) (NIMSE & PAL, 2015).

Descoberta em 1969 por McCord e Fridovich e considerada a primeira linha de defesa contra espécies reativas, as superóxidos dismutases convertem efetivamente $\text{O}_2\cdot^-$ em O_2 e H_2O_2 por oxidação e redução, respectivamente (MCCORD & FRIDOVIC, 1969). Possuem 3 isoformas: SOD1, forma dimérica citosólica de cobre-zinco, SOD2 superóxido dismutase de manganês tetramérico mitocondrial e a SOD3, forma tetramérica que é secretada na matriz extracelular (MONDOLA *et al.*, 2016; LEE, CHA & LEE., 2020).

Um outro grupo de enzimas, as glutathionas peroxidases (GPxs) são uma família de oxidorreduções que promovem a redução do H_2O_2 . Está localizada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias e até então 8 isotipos são conhecidos (GPx1 – GPx8), sendo glutathiona peroxidases dependentes de selênio (GPX1-4 e 6) e três congêneres que não possuem selênio, (GPX 5, 7 e 8) e que possuem cisteína ao invés de selenocisteína na sua estrutura (BRIGELIUS-FLOHÉ & MAIORINO, 2013).

A catalase, proteína tetramérica contendo um grupo heme, está localizada nos peroxissomos, no citoplasma e nas mitocôndrias. É uma enzima responsável

pela conversão de H_2O_2 em água e em oxigênio, usando ferro ou manganês como cofator (KIM *et al.*, 2015).

Os mecanismos não enzimáticos também interrompem a sucessão de eventos oxidantes. São moléculas de baixo peso molecular como a γ -L-glutamil - L - cisteinil- glicina (GSH), composta por três aminoácidos - cisteína, glicina e ácido glutâmico e considerada o antioxidante mais importante sintetizado nas células. Outros antioxidantes provenientes da dieta, como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) (FORMAN, ZHANG & RINNA, 2009), β -caroteno e compostos polifenólicos como os flavonoides (LEE & ULATOWSKI, 2019; NIMSE & PAL, 2015; PARK & ELLIS, 2020) atuam como agentes redutores dos radicais livres (MEŠČIĆ MACAN, GAZIVODA KRALJEVIĆ & RAIĆ-MALIĆ, 2019). A desregulação desses diversos mecanismos implica na patogênese de doenças humanas, incluindo os distúrbios neurodegenerativos relacionados ao aumento do estresse oxidativo como acontece nas doenças de Alzheimer e Parkinson (DU *et al.*, 2022; HSIEH & YANG, 2013; HAMBRIGHT *et al.*, 2017; SMEYNE & SMEYNE, 2013).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O cérebro é um órgão com alta taxa metabólica caracterizada pela intensa produção de espécies reativas (LUSHCHAK *et al.*, 2021). Embora as espécies reativas sejam associadas ao declínio funcional do cérebro correlacionado ao envelhecimento, em baixas concentrações, participam de funções homeostáticas como parte das vias de transdução de sinais envolvidos nos processos imunes, crescimento, diferenciação, progressão e morte celular (ZHANG *et al.*, 2016; MASSAAD & KLANN, 2011).

Algumas células apresentam discreta produção de espécies reativas quando estimuladas por interleucinas (IL-1, IL-6, dentre outras), fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento como o NGF e PDGF, fator de crescimento nervoso e derivado de plaquetas, respectivamente. Isso elucidou que ERO's participam da iniciação e/ou manutenção adequada de vias de transdução de sinal, em diferentes níveis da cascata de sinalização, atuando como segundos mensageiros, através das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK's), mediando funções importantes como morte celular programada (MULDER,

2000; VALKO *et al.*, 2007;) e ativação de fatores de transcrição como o NFκB via TNF e IL-1 (BAUD & KARIN, 2001).

O tecido nervoso é um tecido suscetível à oxidação devido a alta produção de ERO's, altos níveis de ácidos poliinsaturados susceptíveis à peroxidação, defesas antioxidantes relativamente baixas e regeneração limitada (LEE, CHA & LEE, 2020; SINGH *et al.*, 2019). As células gliais, como astrócitos e microglia, demandam um maior consumo de oxigênio e glicose para o funcionamento fisiológico do cérebro, o que resulta na geração de um pool contínuo de ATP, tornando o cérebro também suscetível ao consumo constante de oxigênio, gerando ainda mais radicais livres (UTTARA *et al.*, 2009).

Este acúmulo de moléculas instáveis no encéfalo pode levar ao estresse oxidativo, regulador chave na fisiopatologia do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, que consistem na perda patológica de neurônios e/ou mielina (VERKHRATSKY *et al.*, 2015) como acontece nas doenças de Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Huntington e na esclerose múltipla (SINGH *et al.*, 2019). Estes distúrbios na sua maioria, resultam em sintomas irreversíveis como declínio cognitivo que se traduzem em danos físicos e mentais, gerando custos significativos no âmbito da saúde e social (WEN *et al.*, 2020). No entanto, é difícil determinar quando, no processo da doença, esses danos ocorrem e quão influentes são na progressão dessas doenças (DRUMMOND *et al.*, 2017).

Os astrócitos, classe de células neurais que possuem origem neuroectodérmica (VERKHRATSKY & NEDERGAARD, 2018), é a maior população de células da glia do SNC, constituindo até 40% do número total de células do encéfalo humano. São células altamente heterogêneas em forma e função, realizam atividades homeostáticas, neuroprotetoras e metabólicas, estabilizam e regulam a barreira hematoencefálica (BHE), os níveis de fluidos extracelulares, tamponam altas concentrações de íons, além de absorver e recaptar o excesso de neurotransmissores, como o glutamato (HERCULANO-HOUZEL, 2014; VASILE, DOSSI & ROUACH 2017; OBERHEIM, GOLDMAN & NEDERGAARD, 2012; RANSOM & RANSOM, 2012; BENARROCH, 2005). Estas células expressam receptores de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMP (padrões moleculares associados a danos ou perigos), participam da

resposta imune inata, secretam fatores que ativam as células cerebrais vizinhas, amplificando a resposta imune inata e promovendo mudanças na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Tudo isso resulta no recrutamento de células imunes da circulação sanguínea para o parênquima do SNC, que atuam na resposta imune adaptativa (SOFRONIEW, 2020; FARINA, ALOISI & MEINL, 2007).

Os astrócitos também desempenham papel significativo na manutenção das defesas antioxidantes, podendo exercer função crítica neurotóxica, regulando positivamente marcadores inflamatórios como ERO/ERN, IL1 β , IL-6, TNF- α ou atuando como neuroprotetor, regulando, por exemplo, alguns mediadores como Arginase 1 e NRF2 (fator nuclear derivado de eritroide 2), importante na indução de genes desintoxicantes (LIDDELOW & BARRES, 2017; LEE *et al.*, 2019; NEAL *et al.*, 2018; HOSTENBACH *et al.*, 2014), principalmente enzimas antioxidantes como SOD e GPx (KIM *et al.*, 2015).

Um dos mecanismos de defesa clássico dos astrócitos às lesões cerebrais, doenças, insultos como o estresse oxidativo e a neuroinflamação, é a astrogliose reativa. Na forma sutil, apresenta grande potencial resolutivo do mecanismo gerador da lesão, limitando o local do dano, regulando a neuroinflamação e promovendo a recuperação neuronal pós-lesão (SOFRONIEW & VINTERS, 2010) em que as células retornam para o estado homeostático. Em níveis extremos de dano e inflamação, os astrócitos podem formar a cicatriz glial gerando mudanças estruturais duradouras (SOFRONIEW, 2009; VOSKUHL *et al.*, 2009), tornando-se hipertróficos, apresentando alta imunorreatividade de proteínas como vimentina e nestina (CHEN *et al.*, 2020) e também da proteína fibrilar ácida glial (GFAP), uma proteína de filamento intermediário do citoesqueleto (CARTER *et al.*, 2019; HOL & PEKNY, 2015) onde mudanças na sua expressão, podem apontar plasticidade adaptativa homeostática, além de resposta a estímulos neuroinflamatórios.

Diversos estudos apontam a importância da superóxido dismutase no processo de regulação das doenças neurodegenerativas. A SOD1, está localizada principalmente em astrócitos em todo o SNC, mas a enzima também é detectável nos neurônios (LINDENAU *et al.*, 2000). De forma geral, mutações em SOD1 foram identificadas como a principal causa da forma familiar autossômica

dominante da ELA (ROSEN *et al.*, 1993; BERDYŃSKI *et al.*, 2022) e também estão correlacionadas às doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP), onde apresentam-se em níveis elevados, na forma de agregados não fibrilares, que estão associados a placas senis amiloides e lesões marcantes de degeneração, compartilhando mecanismos patogênicos comuns da DA e DP (CHOI *et al.*, 2005). Outras isoformas como a SOD2, está localizada exclusivamente dentro das mitocôndrias e é observada em maior quantidade nos neurônios do que em células gliais, ao menos que estas células estejam em processo de gliose, observados em células microgliais e oligodendrócitos. Todas as isoformas da superóxido dismutase regulam os processos antioxidantes em doenças neurodegenerativas (TRIST *et al.*, 2021; MAIER & CHAN, 2002; KRAMER, *et al.*, 2002).

O complexo sistema antioxidante do Sistema Nervoso Central (SNC) depende principalmente da glutathiona, e a maior concentração de GSH é encontrada nas células gliais do córtex (ISKUSNYKH, ZAKHAROVA & PATHAK, 2022). A glutathiona atua eliminando espécies reativas, através de reação direta não enzimática ou doando elétrons para glutathiona peroxidase (GPx) (LUSHCHAK, 2012). Em modelos de co-cultura neurônio/glia, a remoção do astrócito impediu a síntese neuronal de glutathiona, facilitando a toxicidade do microambiente por espécies reativas. Neste modelo de cultura, *in vitro*, um astrócito é capaz de proteger até 20 neurônios (DRINGEN, PFEIFFER & HAMPRECHT, 1999; DESAGHER, GLOWINSKI & PREMONT, 1996). Alguns estudos demonstraram a correlação entre glutathiona reduzida (GSH) e SOD, onde a glutathiona reduzida pode operar como fonte alternativa de ativação de SOD, uma vez que GSH também está implicada nos mecanismos de entrega de cobre (Cu) para SOD1, num estudo de ELA. Isto foi demonstrado em modelo de camundongos CCS^{-/-}, (chaperona de cobre para SOD) onde acreditava-se, desde a sua descoberta, em 1997, que era o único meio de ativação da SOD 1 (CARROLL *et al.*, 2004; CULOTTA *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 2000).

Já o óxido nítrico (NO), é um neurotransmissor não convencional, com ausência de armazenamento de vesículas, sendo produzido sob demanda neuronal. Neurônios, células gliais e células endoteliais podem expressar NOS sendo potenciais fontes de NO no encéfalo (TAJES *et al.*, 2013). As três isoformas

tradicionais da enzima óxido nítrico sintase são NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS). Além da isoforma NOS mitocondrial (mtNOS), sendo considerada nas células cerebrais, uma isoforma da nNOS expressa na membrana interna mitocondrial (LACZA, PANKOTAI & BUSIJA, 2009; TATOYAN & GIULIVI, 1998; HIBBS JR, 1988).

Na astrogliose reativa, a indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produz grandes quantidades de óxido nítrico (NO) que combina-se com o ânion superóxido, na formação de peroxinitrito (OONO^-) contribuindo para a neuroinflamação e danos nos tecidos cerebrais. Esta isoforma é encontrada principalmente nas células da glia, como microglia e astrócitos e é ativada em resposta ao reconhecimento de microorganismos com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (MONCADA & BOLAÑOS, 2006; REIS *et al.*, 2017).

As terapias modernas fornecem apenas o tratamento dos sintomas em vez de regular os mecanismos patológicos. A multiplicidade de fatores que levam ao fenótipo da doença aliados a resposta heterogênea dos pacientes e o obstáculo crítico de medicamentos que não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), representam os grandes desafios para o desenvolvimento de terapias eficazes para as doenças neurodegenerativas (ABORODE *et al.*, 2022). Deste modo, é importante explorar os antioxidantes alternativos e multifuncionais como agentes potenciais para o tratamento de distúrbios neurológicos.

2.2.1 Flavonoides: promissores adjuvantes terapêuticos

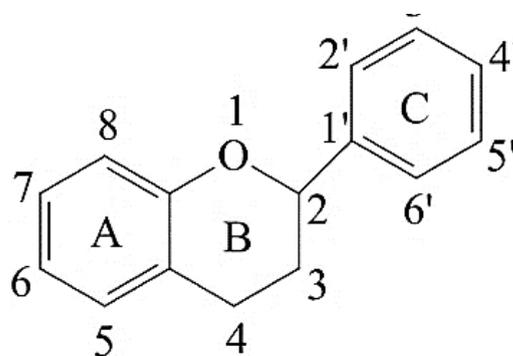
As plantas medicinais desenvolvem, até os tempos atuais, importante papel no tratamento ou cura de doenças. Detentoras de uma grande variedade de compostos fitoquímicos, são consideradas matéria prima para desenvolvimento e produção de medicamentos. Apesar do crescente uso de medicamentos alopáticos, as plantas medicinais ainda são fortemente utilizadas para a manutenção da saúde humana (PATEL e PATEL, 2017).

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor mundial de laranja e o maior exportador do suco da fruta (US Department of Agriculture, 2022), contribuindo fortemente para o agronegócio brasileiro. Um grande grupo de compostos fenólicos presentes em plantas, conhecidos como flavonoides, podem ser

obtidos pela síntese orgânica através da Química Verde. A Química Verde tem como objetivo principal reduzir o uso de produtos químicos e reagentes tóxicos gerando o mínimo de resíduos por meio da utilização de equipamentos com alta eficiência energética causando menos impacto ambiental, alcançando assim a sustentabilidade (SAJID & PLOTKA-WASYLKA, 2022).

Um dos 12 princípios da Química Verde é a utilização de fontes de matérias-primas renováveis com o uso de biomassa, como a extração de produtos de alto interesse da indústria farmacêutica. Victor e colaboradores (2021), obtiveram pela primeira vez, flavonoides isolados dos resíduos de cascas de cítricos como a laranja comum [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e toranja (*Citrus paradisi* (L.) na obtenção da hesperidina (3',5,7-tri-hidróxi-4'-metóxi-flavanona-7-O-rutinosídeo) e naringina (4',5,7-tri-hidróxi-flavanona-7-O-rhamnoglucosídeo), respectivamente, gerando um grande potencial na utilização da biomassa das frutas em questão para a produção de compostos fenólicos puros e de alto valor agregado em aplicações de suas propriedades antioxidantes (BARRETO, *et al.*, 2023).

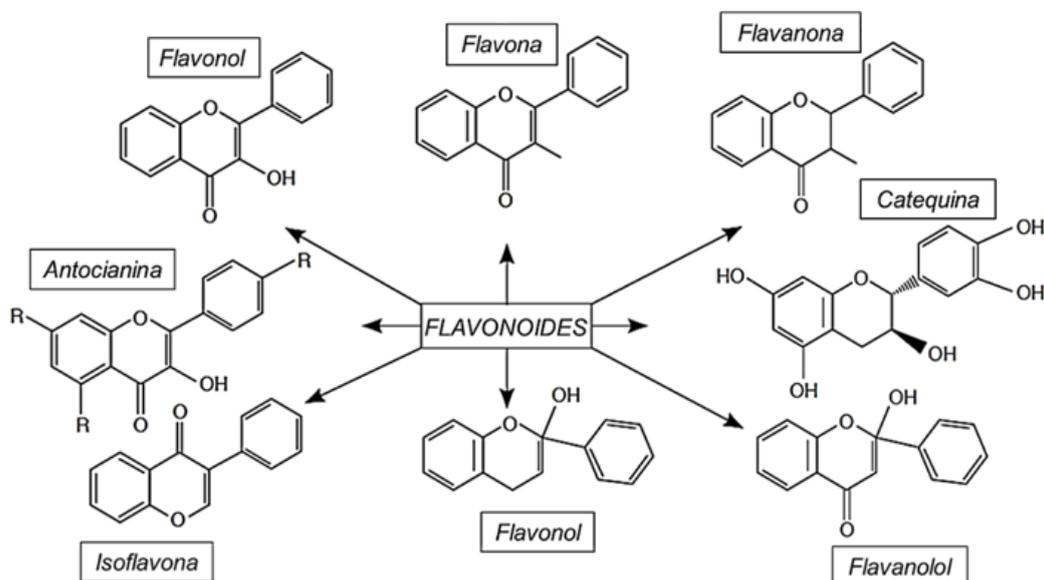
Figura 1 - Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Kumar & Pandey (2013)

De acordo com Kumar e Pandey (2013), a estrutura básica dos flavonoides é de 15 carbonos, sendo dois anéis benzenos (anéis A e C) ligados por um anel pirano heterocíclico (anel B) (Fig.1). Esta estrutura, seguida de modificações como hidroxilação, por exemplo, garantem diversas propriedades biológicas aos compostos fenólicos e a diversidade do grupo, como as flavonas e flavanonas (Fig.2) (PETERSON & DWYER, 1998; PATEL; SINGH & PATEL, 2018).

Figura 2 - Diversidade dos flavonoides



Fonte: Patel; Singh e Patel, 2018 (Adaptado)

A principal característica dos flavonoides é a alta capacidade antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1995) e apesar desses compostos serem degradados em ácidos fenólicos após a metabolização, ainda assim, de acordo com Pietta (2000) possuem capacidade de eliminar os radicais livres quando consumidos.

A partir da atividade antioxidante dos flavonoides, outras propriedades foram investigadas, como a capacidade antiinflamatória (KOUHESTANI, JAFARI & BABAEI, 2018). No estudo de DA SILVA *et al.*, (2019), através do teste de RT-qPCR os autores evidenciaram que os flavonoides rutina e quercetina promoviam aumento da expressão de mRNA para IL-1 β (Interleucina 1 beta), NOS2 (Óxido Nítrico Sintase 2) e redução significativa da expressão de mRNA para IL-6, TGF β (fator de crescimento transformante beta) e arginase, sugerindo o controle da resposta inflamatória exacerbada. Já em modelos *in vitro* de co cultura neurônio/glia, os flavonoides participaram não somente da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL1 β em modelos de neuroinflamação induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (DE ALMEIDA *et al.*, 2020), como também na redução da expressão da citocina pró-

inflamatória IL-6 e aumento da expressão de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) em um modelo da doença de Alzheimer (DOURADO *et al.*, 2020).

Outros estudos também demonstram a capacidade dos flavonoides, de atenuar o estresse oxidativo, através do aumento da atividade enzimática da SOD e GSH-Px além da redução do malondialdeído (MDA) no modelo de lesão cerebral isquêmica (GUO *et al.*, 2019), redução dos níveis de NO com administração de doses de 21mg/kg de quercetina (*Urtica dioica*) em modelo de estresse crônico hipocampal em camundongos, num estudo delineado por Mehta, Parashar & Udayabanu (2017).

Devido aos flavonoides possuírem menor solubilidade em meio aquoso e maior possibilidade de degradação no meio fisiológico, sua bioatividade é limitada. Sendo assim, para melhor otimização dos efeitos de flavonoides, alguns estudos foram realizados a fim de estudar a biodisponibilidade destes compostos. Para tanto, o estudo de Krishnakumar e colaboradores (2011) avaliou, *in vitro*, o flavonoide naringenina (NAR), investigando o desenvolvimento de mecanismos que protegessem esta molécula da degradação. Para isto, desenvolveram nanopartículas carregadas de naringenina (NARNPs) do inglês *naringenin-loaded nanoparticles* ou nanopartículas carregadas de naringenina. A eficácia terapêutica da molécula foi analisada utilizando o ensaio do MTT que demonstrou que a atividade citotóxica dos NARNPs era superior que a do NAR livre, resultando em 14% de viabilidade de células HeLa. Os autores concluíram que as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µg/mL das NARNPs foram dose-dependentes para atividade citotóxica nas células. Outros mecanismos como adição de ciclodextrina (WEN *et al.*, 2010), nanoformulações incluindo lipossomas, nanopartículas poliméricas e nanoemulsões (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2011; SHARMA, *et al.*, 2022) e administração de componentes naturais via intranasal (KARTHIKA *et al.*, 2022) podem melhorar a biodisponibilidade e consequente eficácia terapêutica de flavonoides. Porém, ainda não foi elucidado por quais mecanismos os metabólitos dos polifenóis atravessam a BHE (Barreira Hematoencefálica) se por difusão simples ou através de carreadores específicos (FIGUEIRA *et al.*, 2017).

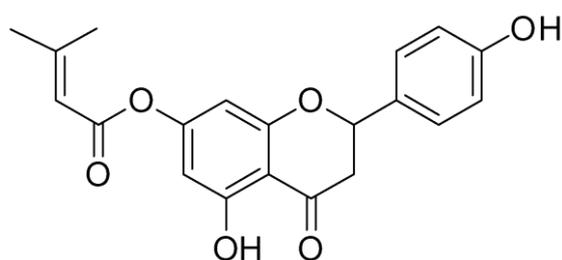
Apesar de alguns dos receptores encontrados na BHE já serem identificados, como: receptor de transferrina (TfR), receptor de lipoproteína de

baixa densidade (LDLR), receptor leptina e receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), foi verificada uma estratégia inovadora para contornar o BBB através da entrega mediada por células, onde leucócitos e células-tronco são usados como transportadores para entregar nanossistemas ao cérebro (TEIXEIRA, *et al.*, 2023).

Por outro lado, os flavonoides também podem se combinar com outras moléculas na natureza, como os grupamentos prenílicos, na formação de compostos prenilados, constituindo uma subclasse de flavonoides. Possuem atividades biológicas como antibacterianos e antitumorais (NAGO *et al.*, 2021; GIRISA *et al.*, 2021) e vem sendo descritos na literatura como o grupo de compostos com potencial antioxidante e antineuroinflamatório (SANTOS & SILVA, 2020), onde a prenilação aumenta a lipofilicidade dos flavonoides, resultando em maior afinidade pelas membranas biológicas e uma melhor interação com proteínas alvo (XU *et al.*, 2012).

No entanto, a ocorrência natural de flavonoides prenilados, que combinam a porção flavonoide e a cadeia lateral do grupamento prenil lipofílico (Fig.3), é baixa, o que limita a aplicação desses compostos bioativos em produtos farmacêuticos e, portanto, a síntese orgânica dessas moléculas é uma boa maneira de obtenção (YANG *et al.*, 2015).

Figura 3 - Estrutura da 7-O-Prenilnaringenina



Fonte: Autora

Um ensaio realizado por Rahman *et al.*, (2010) demonstrou que flavonoides prenilados possuem atividade de eliminação do radical DPPH e ABTS. Promovem o enzimático da catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase em células de macrófagos, induzido pelo LPS (LI *et al.*, 2018). Outros estudos elucidaram que alguns prenilflavonoides da *Fructus psoraleae*, como a

isobavachalcona (5 μM) diminuiu os níveis de IL-6 e IL-1 β em modelos de DP, induzido por MPTP, em camundongos e reduziu a expressão de citocinas TNF - α , IL-6, IL-1 β e IL-10 em células BV-2 estimuladas por LPS (0,1 μM /mL) (JING *et al.*, 2017). Prenilflavonoides como a morachalcona D (0-40 μM /6h), da folha da amoreira, suprimiu de forma significativa a produção de ROS e os níveis de depleção da GSH, esta, de forma dose-dependente, em células HT22 derivadas de neurônios de camundongos, onde o estresse oxidativo foi induzido pelo glutamato (6mM) (SEO *et al.*, 2015).

Sendo assim, encontrar substâncias exógenas que consigam modular as enzimas ou reduzir as espécies reativas é um passo importante para o controle do estresse oxidativo e consequente neuroinflamação.

3. HIPÓTESE

Flavonoides e derivados de síntese possuem atividade antioxidante e atenuam neuroinflamação associada a resposta das células gliais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante e antineuroinflamatória de flavonoides e derivados de síntese frente a dano inflamatório em células gliais.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial citotóxico dos flavonoides e derivados de síntese em células astrocíticas.
2. Avaliar as vias enzimáticas antioxidantes dos flavonoides e derivados de síntese durante o estímulo inflamatório.
3. Analisar a resposta astrocítica antineuroinflamatória de flavonoides e derivados de síntese através de parâmetros funcionais e estruturais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

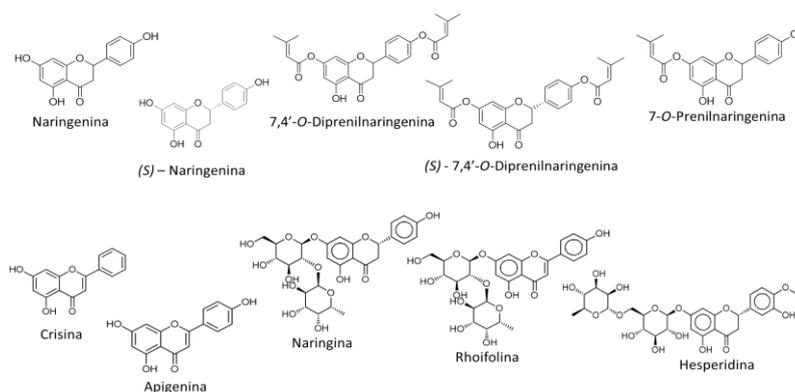
Este trabalho faz parte de um amplo projeto intitulado "Bioprospecção farmacológica de produtos naturais e derivados em células do sistema nervoso central", e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal atendendo todas as exigências legais e todos os aspectos éticos estabelecidos, inclusive a legitimidade das informações, o sigilo necessário e a posterior publicação dos benefícios e resultados para o progresso do desenvolvimento científico. Para esta, os animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, onde foram submetidos a procedimentos segundo o protocolo já bem estabelecido no LabNq e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS) com Protocolo nº 6731220818 (ID 000058).

5.1 Obtenção das moléculas e diluições

Os derivados de síntese dos flavonoides naturais (Fig.4) foram desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular – GPSQ-UFBA, em Salvador – BA através do Professor Dr. Mauricio Victor do Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, da Universidade Federal da Bahia. A molécula padrão (substrato) naringenina foi extraída da casca da toranja (*Citrus paradisi*) e a partir da naringenina foi obtida a (S) – naringenina através de hidrólise ácida. Através de diversas modificações estruturais destes dois flavonoides, resultantes da esterificação da flavanona (naringenina) com ácido seneciico foram geradas outras 3 moléculas: 7-O-prenilnaringenina ; 7,4'-O-diprenilnaringenina e a (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina. Da toranja também foi extraída a naringina que através de algumas modificações estruturais resultou na obtenção da flavona rhoifolina (sintetizada por oxidação da naringina) e também da apigenina (sintetizada a partir da oxidação e hidrólise ácida da naringina).

Hesperidina foi obtida do albedo da laranja comum (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). A crisina foi adquirida (CAS Number: 480-40-0). Os produtos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e as atribuições de regioseletividade confirmadas por efeitos eletrônicos (alterações de deslocamento químico) observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C

Figura 4 - Estrutura química de flavonoides de naringenina e seus derivados prenilados e de flavonoides crisina, apigenina, naringina, rhoifolina e hesperidina.



Fonte: Autora

Para a utilização nos testes, as moléculas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 mM, formando soluções estoque e mantidas à temperatura de -20 °C. Como condição controle foi considerado o DMSO, veículo de diluição das moléculas, em volume equivalente (máximo 0,1%). As diluições finais de cada uma das moléculas foram preparadas de acordo com estudos prévios do grupo (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2019) e no momento do tratamento, diluiu-se às diretamente em meio de cultura DMEM isento de Soro Fetal Bovino (SFB).

5.2 Teste do DPPH (*cell-free* teste)

O ensaio de eliminação de radicais DPPH• foi realizado de acordo com o método descrito por Blois (1958) com algumas modificações para microplaca de 96 poços. Na presença de uma molécula antioxidante, o DPPH• aprisiona um átomo de hidrogênio em sua forma hidrazina com a conseqüente perda da cor roxa para amarelo pálido. O efeito antioxidante é proporcional ao desaparecimento da cor, podendo ser facilmente avaliado acompanhando a diminuição da absorção de UV em 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUEVELIER & BERSSET, 1995)

A solução mãe de radical DPPH• foi preparada em metanol de forma a apresentar absorvância entre 0,6 a 0,7 a 517 nm. Volumes de reação de 200µL, contendo 125µM de radical DPPH• foram preparados em metanol e 50µL de

diferentes concentrações de flavonoides ou derivados de síntese (1, 10 e 50 μM) foram incubados a 25 ± 2 °C durante 15 minutos e leitura realizada no leitor de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermoplate) no comprimento de onda de 517 nm. O mesmo procedimento foi feito com o Trolox, usado como padrão em diferentes concentrações (1, 10 e 50 μM). Este teste foi realizado no escuro e em temperatura ambiente. A porcentagem de inibição do DPPH• foi calculada pela seguinte equação: $\text{AA\%} = 100 - [(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) / \text{Abs controle}] \times 100$, sendo amostra: tratamento com flavonoides ou derivados de síntese; branco: metanol; controle: metanol + DMSO 0,05%.

5.3. Cultura de linhagens celulares astrocíticas C6 e GL-15 e tratamentos

As células astrocíticas da linhagem GL-15, derivadas de glioblastoma humano (BOCCHINI *et al.*, 1991) foram mantidas em meio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium - Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino; 44 mM de bicarbonato de sódio; 1% de penicilina; 1% de estreptomicina; 7 mM de glicose (Isofarma, CE, Brasil), e incubadas, a 37 °C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO_2 , sendo cultivadas em placas de petri aderentes de 100 mm de diâmetro contendo 10 mL de meio, com SFB, substituído a cada 48 h.

Após a confluência de 80%, as células da linhagem astrocíticas GL-15 foram dissociadas utilizando-se a solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% (Tripsina/EDTA, Sigma Aldrich, Saint Luis, MO, USA, 9002077) diluída em PBS (Tampão fosfato-salino) isento de cálcio e magnésio, durante dois minutos em estufa e replaqueadas em placas de poliestireno de 96 poços, a uma densidade de $7,5 \times 10^4$ células/poço para o teste do MTT. O mesmo procedimento foi realizado para a linhagem celular astrocíticas C6 derivada de glioma de rato, induzida quimicamente por metil-nitrosureia (BENDA *et al.*, 1968).

As culturas foram mantidas em condições controle, tratadas com o veículo de diluição dos flavonoides (DMSO 0.1%), ou tratadas com os flavonoides e derivados de síntese (1, 10, 50 e 100 μM). Após 24h as culturas foram processadas para análise do MTT.

5.4 Cultura primária de glia enriquecida de astrócitos e tratamentos

Foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (P0-P2), obtidos do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). Os procedimentos adotados estão em conformidade com as Diretrizes Brasileiras de Boas Práticas para Produção, Manutenção e Utilização de animais em atividades de Pesquisa Científica e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS) com Protocolo nº 6731220818 (ID 000058).

A cultura primária de glia de astrócitos foi preparada de acordo com o método de Cookson & Pentreath (1994) modificado, com protocolo estabelecido no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) (DA SILVA *et al.*, 2019). Os ratos neonatos foram decapitados, tendo seus hemisférios encefálicos expostos e isolados assepticamente. As meninges e vasos sanguíneos foram retirados do córtex com auxílio de pinças. Após esse procedimento, o córtex foi dissecado mecanicamente com pipeta Pasteur e, em seguida, as células foram filtradas em uma membrana de Nitex estéril de 75 µm e plaqueadas em frascos pré-revestidos com poli-D-lisina (25 µg/mL) em PBS e as células suspensas em meio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium - Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino; 44 mM de bicarbonato de sódio; 1% de penicilina; 1% de estreptomicina; 7 mM de glicose (Isofarma, CE, Brasil). As células foram mantidas em garrafas de cultivo, em câmara úmida com 5% CO₂ a 37 °C, ao longo de 10 dias até atingirem confluência. Após este período, foi removido as células da microglia das garrafas de cultura, após agitação a 230 rpm a 37 °C por 3 h, permanecendo no tapete celular, a cultura primária de glia enriquecida de astrócitos de acordo com o protocolo estabelecido por Da Silva e colaboradores (2019). Nesta cultura foi acrescentado um novo meio DMEM (Gibco, Gaithersburg, MD), suplementado com 10% de SFB (Cultilab, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, 100 UI/mL de penicilina/estreptomicina e 7 mM de glicose e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO₂ por mais 05 dias.

Após esse período, as células da cultura primária de glia enriquecida de astrócito foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% (Tripsina/ EDTA, Sigma Aldrich, Saint Luis, MO, USA, 9002077) diluídos em PBS isento de cálcio e magnésio durante 5 minutos em estufa e com o auxílio da

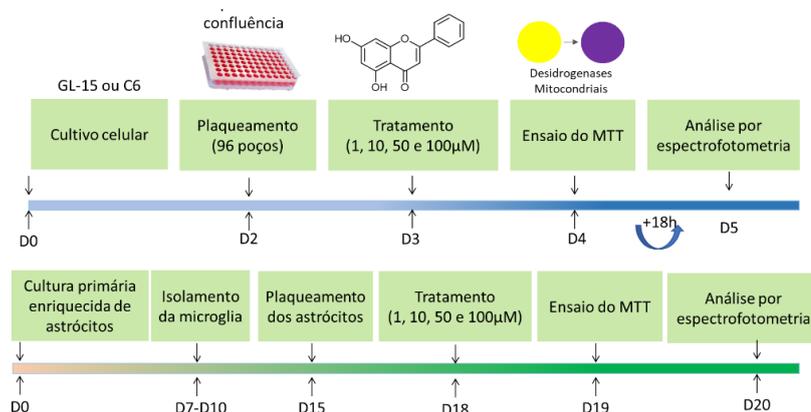
câmara de Neubauer para contagem, foram replaqueadas em placas de poliestireno de 96 poços, a uma densidade de $3,3 \times 10^4$ células/poço ou $2,0 \times 10^5$ em placas de 24 poços para os testes. Lamínulas revestidas com poli-D-lisina (50 µg/mL, Sigma-Aldrich P0671) foram adicionadas nas placas de 24 poços previamente ao estabelecimento das culturas para fins de análises de imunofluorescência.

As culturas foram mantidas em condições controle, tratadas com o veículo de diluição dos flavonoides (DMSO 0.1%), ou tratadas com os flavonoides e derivados de síntese (5 ou 10µM) isoladamente ou após indução de estímulo inflamatório com LPS de *Escherichia coli* (1 µg/ml (Sigma Chemical Company L2880). Após 24h as culturas foram processadas para análises.

5.5 Teste do MTT

A avaliação do efeito da viabilidade celular (Fig.5) foi feita através da atividade mitocondrial após 24h de tratamento. Foi realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MTT, Thermo Fisher), que se baseia na conversão deste sal tetrazólio de cor amarela em cristais de formazan de cor violácea, através das enzimas desidrogenases mitocondriais das células viáveis (HANSEN; NIELSEN & BERG, 1989). Decorrido o tempo de tratamento, foi adicionado 100 µL da solução de MTT (5mg/mL) diluído em meio DMEM na concentração de 1 mg/mL em cada poço das placas, que foram levadas à câmara úmida com 5% de CO₂ a 37 °C por 2 h. Após o período de exposição ao MTT, adicionou-se às placas 100 µL da solução tampão de lise (20% de SDS e 50% de DMF, pH 4,7) para a total dissolução dos cristais de formazan, mantendo-a em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada após 18h (overnight), em leitor de microplacas Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermoplate, no comprimento de onda de 595 nm. A viabilidade celular foi representada pelo percentual de células viáveis em relação ao controle (DMSO 0,1%), considerado como 100%, por não apresentar diferença estatística em relação à exposição das células apenas ao controle negativo.

Figura 5 - Delineamento experimental de ensaio de MTT.



Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, (2011)

5.6 Avaliação da glutathiona (GSH)

Para a avaliação da depleção de glutathiona (GSH) (EKLUND *et al.*, 2002) foi utilizada a cultura primária de glia enriquecida de astrócitos. Uma solução estoque do monoclorobimano (MCB) foi preparada em 100 mM em metanol absoluto e estocada a -20°C no escuro. O ADL-butionina-SR-sulfoximina (BSO), um inibidor de síntese específico de GSH (Bailey, 1998), foi utilizado como controle positivo, na concentração de 1 mM e após 24 h de tratamento com os flavonoides e derivados de síntese ($5\mu\text{M}$); as culturas foram então lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas com $50\mu\text{M}$ de MCB em 10 mL de meio de cultura durante 40 min. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS. A detecção da glutathiona na forma livre foi realizada por microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar-Germany, DFC7000, acoplado à câmera AxioCam HRm). As fotografias foram tiradas com um tempo de exposição de 211 ms para todas as amostras onde 8 campos randomizados foram fotografados para análise e as imagens geradas foram analisadas através do Software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

5.7 Avaliação de atividade de superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

Foi utilizado o protocolo de Weydert & Cullen (2010), com modificações. As células foram plaqueadas em placas de 100mm com densidade celular de

$12,0 \times 10^6$ por placa. Após 24h, realizado o tratamento com o controle DMSO 0,01%, flavonoides e derivados de síntese na concentração de $10 \mu\text{M}$. Decorrido o tempo de tratamento (24h), o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas 3 vezes com 5mL de solução salina tamponada com fosfato livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} por 30 s (PBS: KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaHPO_4 8 mM e NaCl 136,9 mM, pH 7,0). Foi removido a maior parte do tampão restando 1,5mL. Com o auxílio do *cell scraper*, as células foram raspadas da superfície da placa, coletadas e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm por 10 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi desprezado, o pellet celular ressuspensão em 100 μL de PBS (pH 7,8) e as amostras sonicadas (Qsonica Q55-110) com amplitude de 40% por 30 segundos por 2 ciclos, em banho de gelo. As amostras celulares foram armazenadas no -70°C para as posteriores análises enzimáticas.

A atividade total de SOD foi determinada medindo sua capacidade de inibir a redução fotoquímica de cloreto de nitroblue tetrazolium (NBT) por $\text{O}_2^{\bullet-}$, conforme descrito por (BEYER JR & FRIDOVICH, 1987). A taxa inicial da reação foi determinada através de absorbância a 560 nm usando um leitor de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermoplate). Inicialmente, 180 μL do mix de reagentes (50 mM PBS (pH 7,8), 14 mM metionina, NBT 75 mM, riboflavina 2 mM, EDTA 0,1 mM) foi misturada com 6 μL da amostra celular. Em seguida, a reação foi iniciada a partir da irradiação de lâmpada fluorescente 9W a 25°C por 9 min (tempo estabelecido após realizar a curva de consumo do mix de reagentes). A inibição do NBT produzido é proporcional à atividade da SOD presente na amostra. A atividade enzimática foi expressa como unidades de atividade de SOD (U) por mg de proteína total. Uma unidade de atividade SOD é expressa como a quantidade da enzima necessária para causar 50% de inibição da redução do NBT sob as condições experimentais. A quantificação das proteínas totais em cada amostra foi obtida utilizando um kit DC para dosagem de proteínas totais (Kit DC Bio-Rad, Hercules, CA, USA), segundo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) modificado.

5.8 Dosagem de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através do acúmulo de nitrito de sódio (NaNO_2) no meio de cultura usando o teste colorimétrico baseado no

reagente de Griess (Wang & Mazza, 2002). Amostras de 50 μ L do sobrenadante da cultura foram coletadas após o tratamento prévio (24h) de estímulo com LPS 1 μ g/ml e / ou tratamento de 24 h com 10 μ M dos flavonoides ou derivados de síntese. Volumes iguais de meio de cultura e reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina e 2% de ácido fosfórico - Sigma Aldrich, Saint Luis, MO, EUA) foram misturados na proporção de 1:1. A mistura foi incubada durante 10 min à temperatura ambiente e mediu-se a absorbância à 540 nm utilizando um leitor de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermoplate). As concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas com base em uma curva padrão de nitrito de sódio (1,26–100 mmol/L NaNO₂).

5.9 Coloração de Rosenfeld

As alterações morfológicas das células astrocitárias frente ao estímulo inflamatório LPS e tratamento com os flavonoides e derivados de síntese foram avaliadas através da coloração de Rosenfeld em placas de 24 poços com densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço. Após o estímulo prévio (24h) com LPS 1 μ g/ml, Sigma Chemical Company L2880, as células foram tratadas por 24h com os flavonoides e derivados de síntese (10 μ M). As células foram lavadas três vezes com Tampão fosfato-salino (PBS) e fixadas com metanol a -20°C por 10 min em temperatura ambiente, em seguida lavadas três vezes com PBS. As células fixadas foram coradas pelo protocolo estabelecido por Rosenfeld (Rosenfeld, 1947). O reagente de Rosenfeld foi adicionado e incubado por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada, secas ao ar e analisadas por microscopia de contraste de fase sem o filtro verde (Nikon TS-100) e em seguida, fotografado por uma câmera digital acoplada ao microscópio.

5.10 Análise Estatística

Os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado através do software GraphPad Prism, versão 5.0 ou 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), sendo expressos como média \pm desvio padrão ou mediana \pm percentis. Os valores de *p* adotados como estatisticamente

significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05 sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Os resultados obtidos com distribuição normal foram representados por média (testes de normalidade *Shapiro-Wilk* ou teste de *D'Agostino e Pearson*), sendo escolhidos testes estatísticos paramétricos usados nas comparações entre grupos tratados e controles. Para os resultados representados por mediana (distribuição não-normal) foram usados testes não-paramétricos. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem em relação ao controle, considerado como 100%.

6. RESULTADOS

6.1 Capacidade antioxidante (*cell-free* teste): flavonoides e derivados de síntese apresentam diferentes atividade antioxidante frente ao radical DPPH

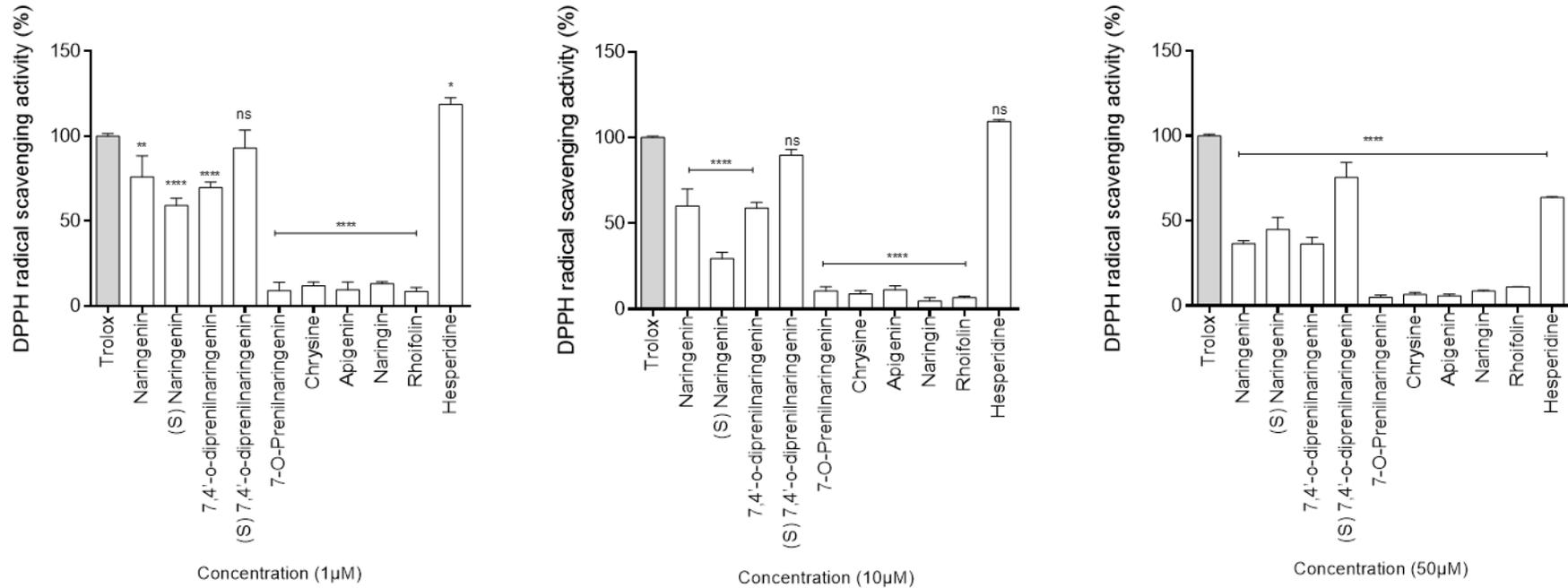


Figura 6: Atividade antioxidante das flavanonas e flavonas na eliminação do radical DPPH ao longo de 15 minutos. Os dados são apresentados como a média com barra de desvio padrão (DP) de três réplicas ($p < 0,05$) quando comparado ao trolox (padrão) para cada concentração (1, 10 e 50 μM).

As moléculas deste estudo constituem duas classes de flavonoides, as flavanonas (naringenina, (S) – naringenina, 7,4'-O-diprenilnaringenina, (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina, 7-O-prenilnaringenina, naringina e hesperidina) e flavonas (crisina, apigenina e rhoifolina) e foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH. Dentre estes flavonoides e derivados de síntese, as flavanonas, apresentaram capacidade superior a 50% comparado com o trolox (39,12%) na eliminação de radicais livres. Hesperidina (118,55%), (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina (93,10%), naringenina (76,06%), (S) – naringenina (59,19%) e 7,4'-O-diprenilnaringenina (69,68%), na concentração de 1 μ M com IC₅₀ na faixa de: 28,02 - 121,48 μ M. Entretanto a partir de 10 μ M houve uma redução da capacidade antioxidante deste grupo de flavonoides, demonstrando que a atividade antioxidante não é dose-dependente. Em contrapartida, as flavonas apresentaram menor capacidade antioxidante, nas três concentrações do estudo (1, 10 e 50 μ M) com capacidade antioxidante semelhantes e suas atividades em todas as concentrações, foi inferior àquela do trolox, mostrando atividade antioxidante muito mais fraca em contraste com o grupo das flavanonas. Entre as moléculas testadas apenas a flavanona hesperidina (118,55% e 109,32%), e o derivado diprenilado (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina (93,09% e 89,70%) nas concentrações de 1 e 10 μ M, respectivamente, apresentaram ser mais efetivas do que o padrão trolox (análogo da vitamina E) utilizado como controle (Fig. 6).

6.2 Flavonoides e derivados de síntese apresentam diferentes efeitos na viabilidade de células astrocíticas.

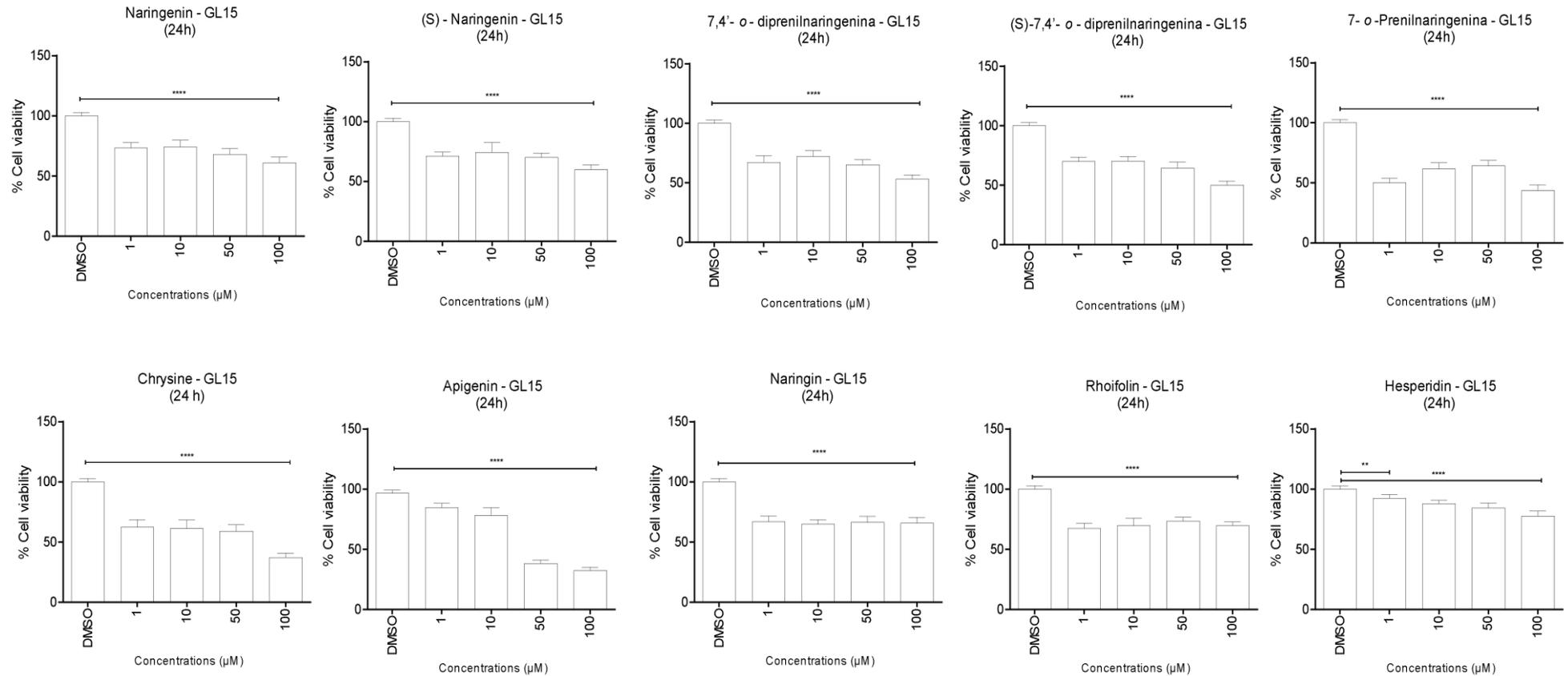


Figura 7 - Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em células astrocíticas humanas da linhagem GL-15. A atividade das desidrogenases mitocondriais foi medida após 24h após exposição das células às moléculas nas concentrações 1, 10, 50 e 100μM ou ao DMSO 0,1% (veículo). Os dados foram analisados através do One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls e pós teste de Dunn. Resultados expressos em média ± DP como porcentagem em relação ao DMSO 0,1% considerado como 100%. (*) representando valores $p < 0,05$; (****) representando valores $< 0,0001$ com diferença estatística em relação ao controle DMSO.

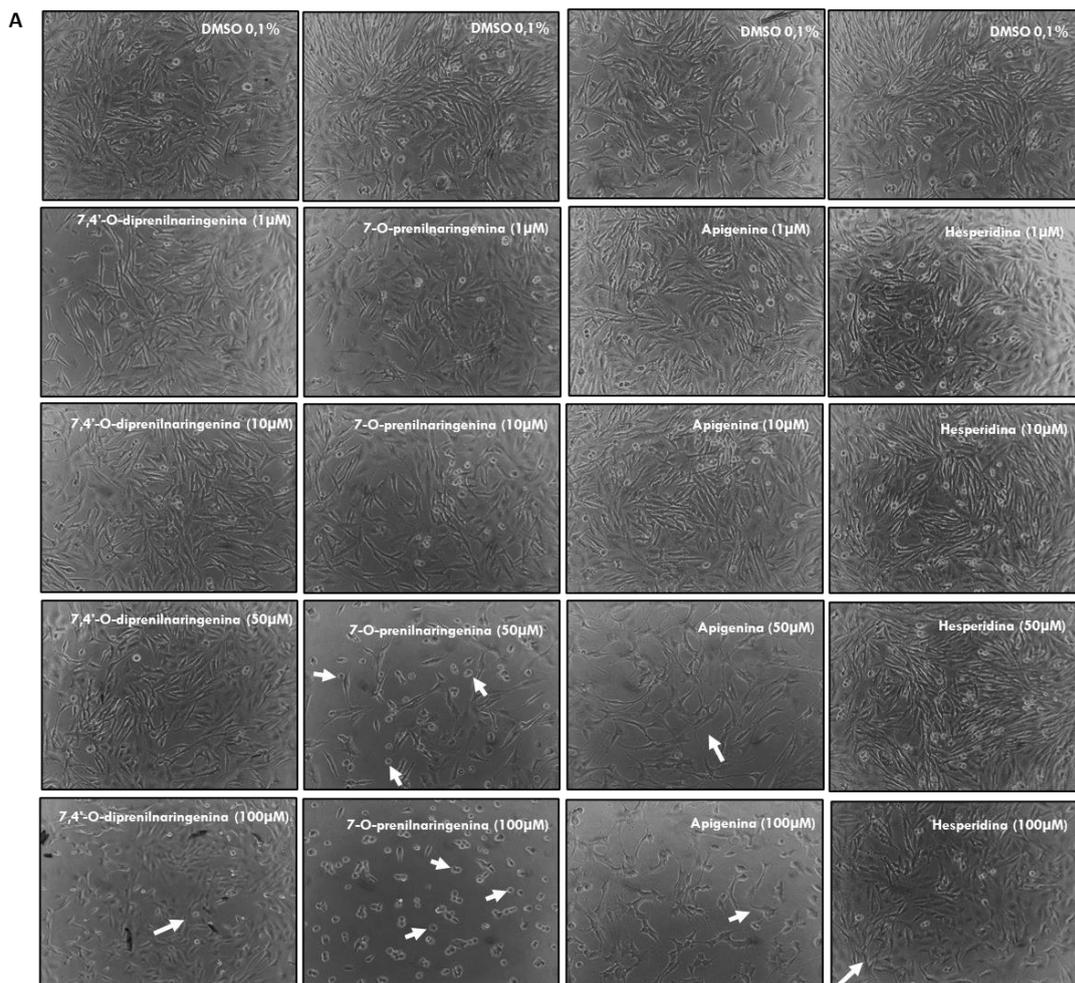


Figura 8 - Fotomicrografia de células astrocitárias humanas da linhagem GL-15 após tratamentos. Foram submetidas por 24h aos flavonoides e derivados de síntese nos tratamentos de: DMSO 0,1% (controle); 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Objetiva 10X. scale bars = 50. Setas brancas indicam alterações morfológicas.

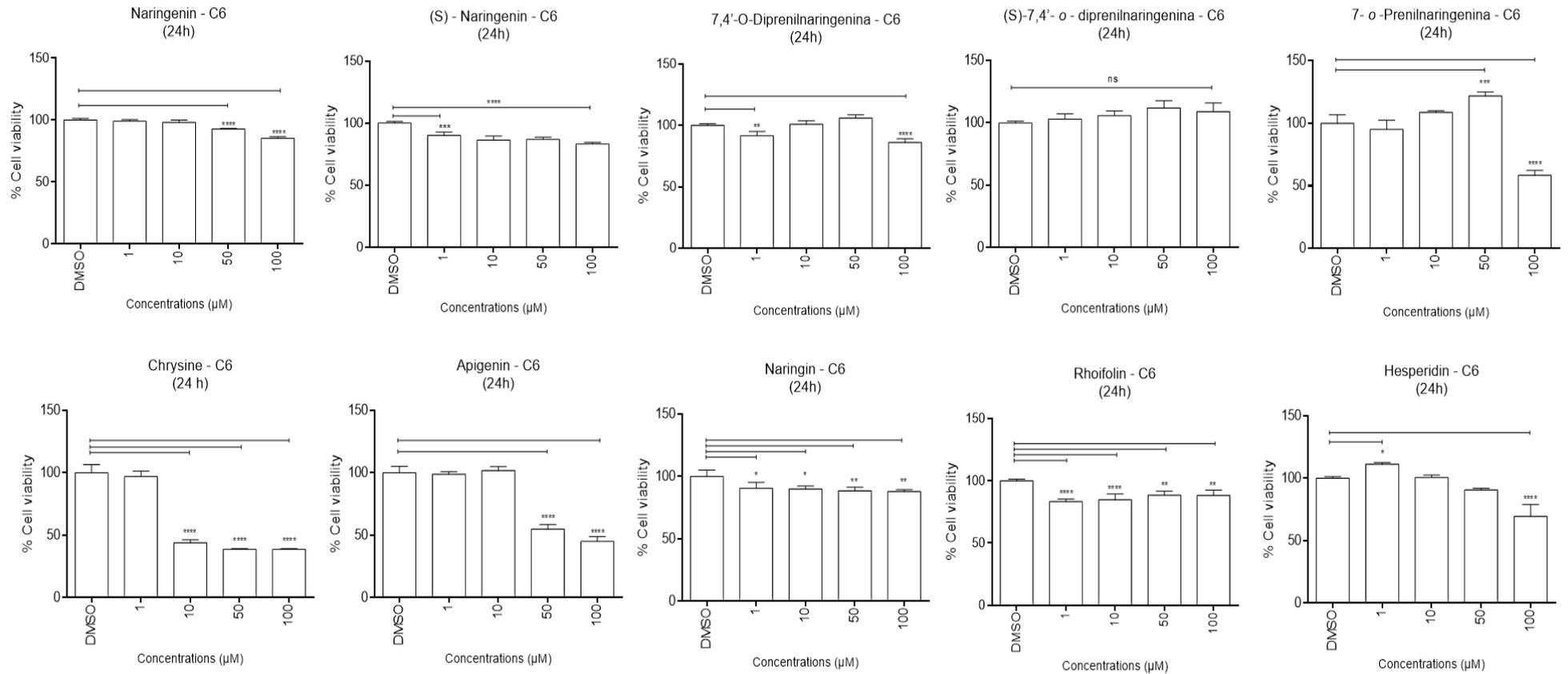


Figura 9 - Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em células astrocíticas murinas da linhagem C6. A atividade das desidrogenases mitocondriais foi medida após 24h após exposição das células às moléculas nas concentrações 1, 10, 50 e 100μM ou ao DMSO 0,1% (veículo). Os dados foram analisados através do One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls e pós teste de Dunn. Resultados expressos em média ± DP como porcentagem em relação ao DMSO 0,1% considerado como 100%. (*) representando valores $p < 0,05$; (****) representando valores $< 0,0001$ com diferença estatística em relação ao controle DMSO.

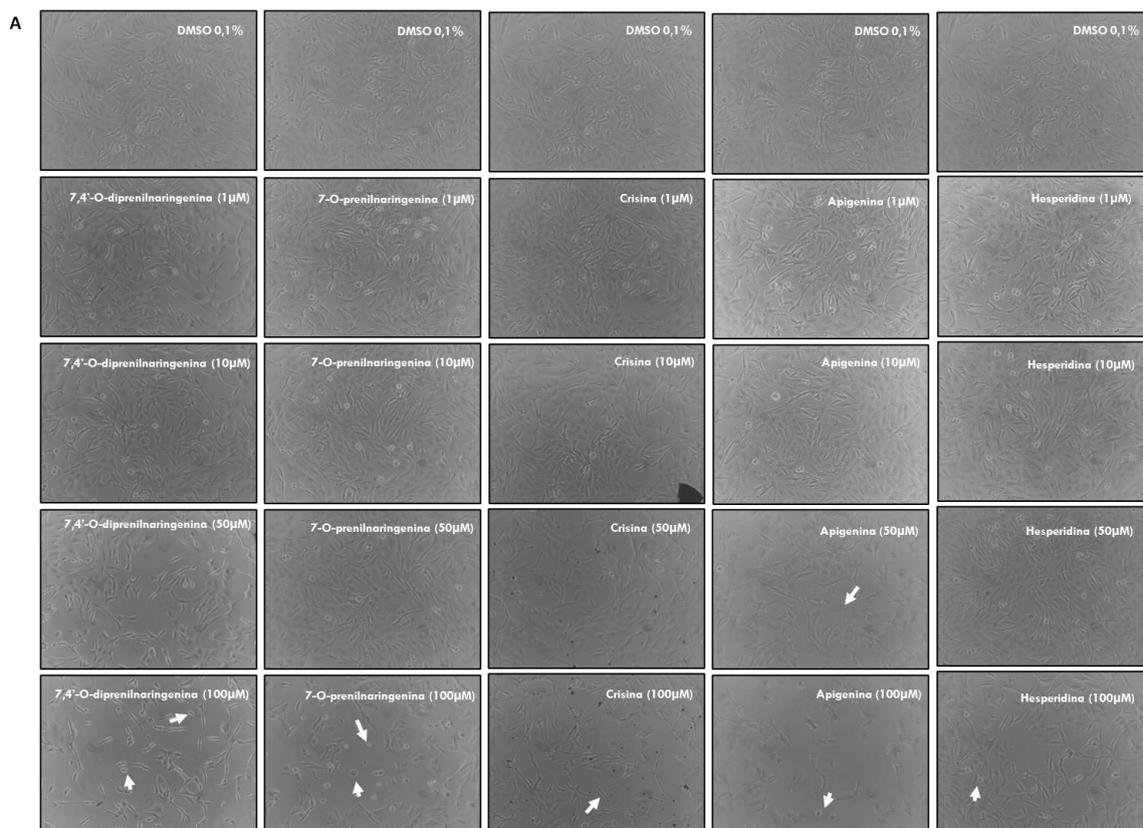


Figura 10 - Fotomicrografia de células astrocárias murinas da linhagem C6 após tratamentos. Foram submetidas por 24h aos flavonoides e derivados de síntese nos tratamentos de: DMSO 0,1% (controle); 1 μM, 10 μM, 50 μM e 100 μM. Objetiva 10X. scale bars = 50. Setas brancas indicam alterações morfológicas.

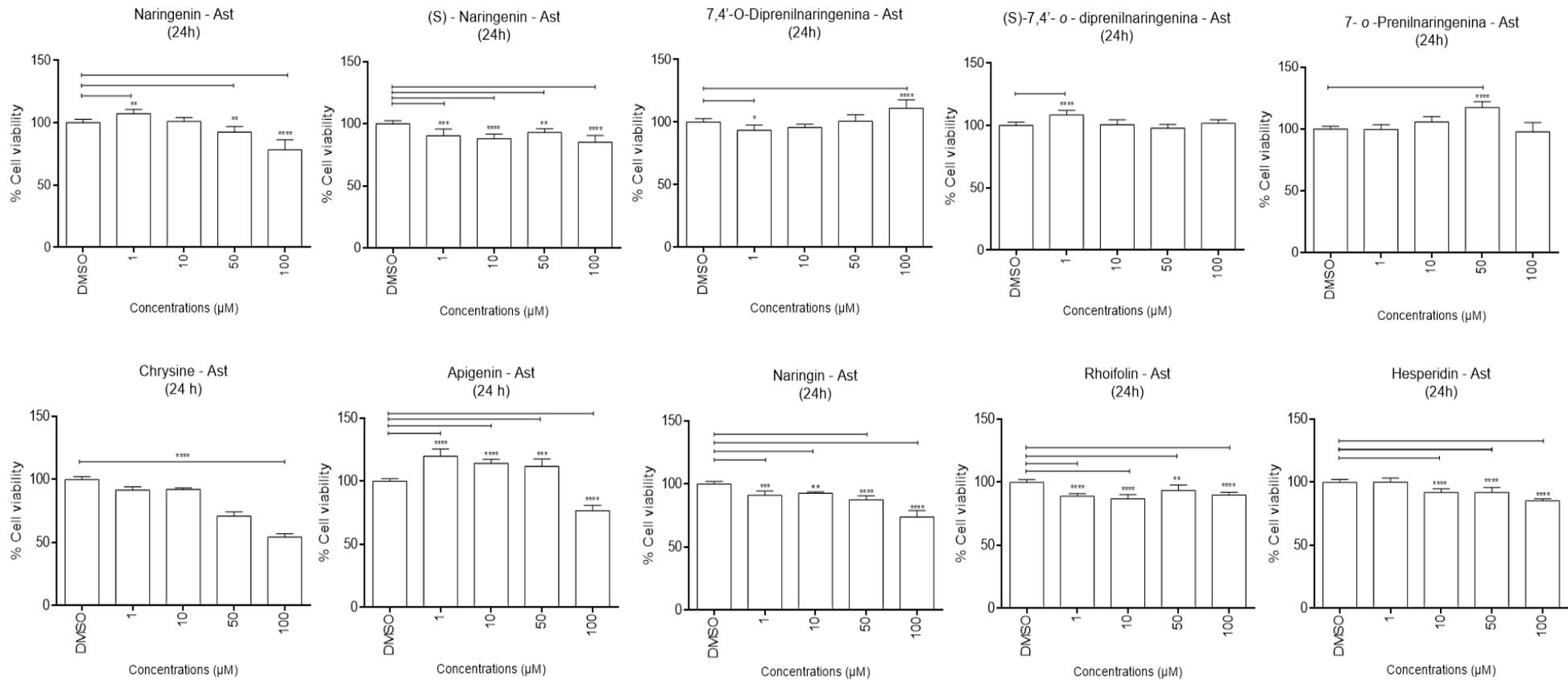


Figura 11 – Prospecção do efeito de flavonoides e derivados sintéticos, através do teste de MTT em culturas primárias de células glias enriquecida de astrócitos. A atividade das desidrogenases mitocondriais foi medida após 24h após exposição das células às moléculas nas concentrações 1, 10, 50 e 100µM ou ao DMSO 0,1% (veículo). Os dados foram analisados através do One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls e pós teste de Dunn. Resultados expressos em média \pm DP como porcentagem em relação ao DMSO 0,1% considerado como 100%. (*) representando valores $p < 0,05$; (****) representando valores $< 0,0001$ com diferença estatística em relação ao controle DMSO.

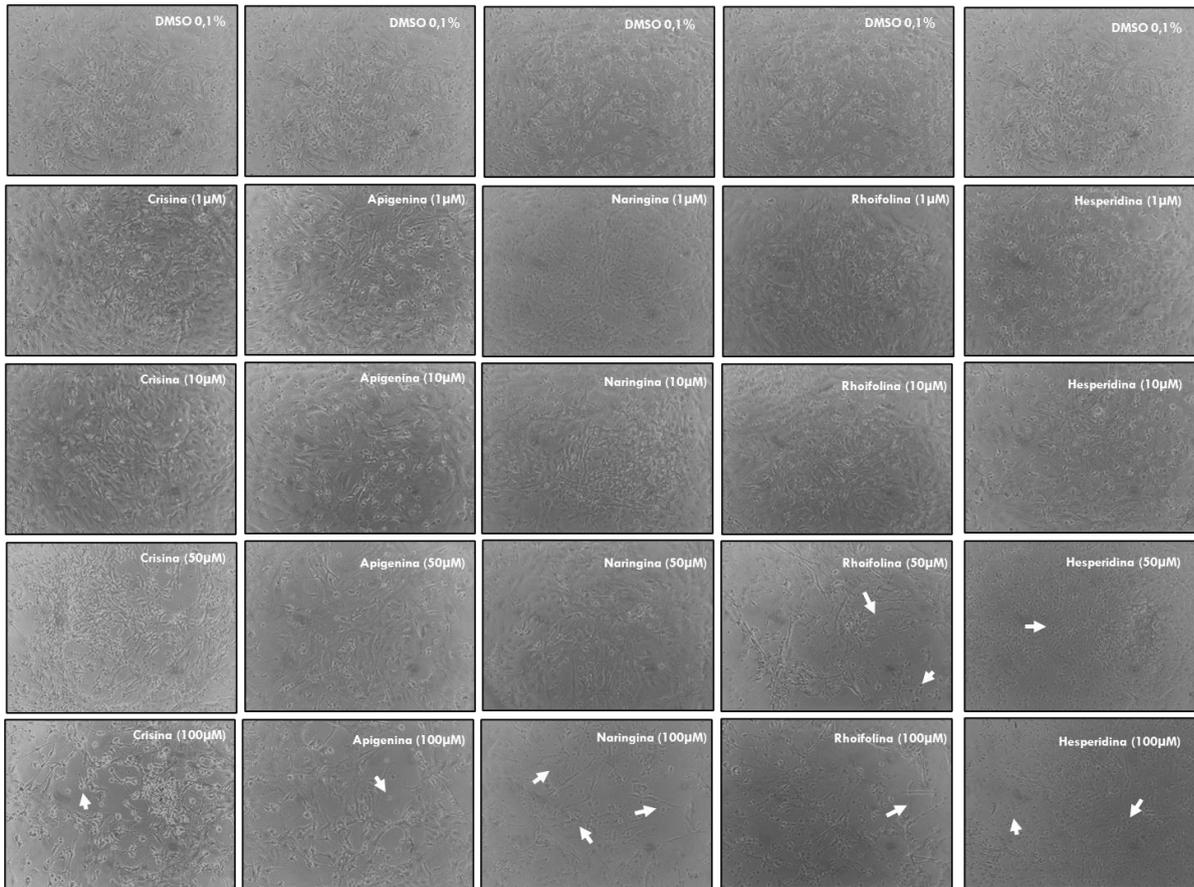


Figura 12 - Fotomicrografia de células em culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos. Foram submetidas por 24h aos flavonoides e derivados de síntese nos tratamentos de: DMSO 0,1% (controle); 1µM, 10µM, 50µM e 100µM. Objetiva 10X. scale bars = 50. Setas brancas indicam alterações morfológicas.

As células da glia participam efetivamente de processos no SNC principalmente nas mudanças morfológicas e fisiológicas necessárias para a homeostase cerebral (ALLEN & BARRES, 2009). Neste sentido, linhagens de células astrocitárias: GL-15, C6 e cultura primária de glia enriquecida de astrócitos vêm sendo utilizadas para estudar a proliferação e viabilidade celular (MEAD & PENTREATH, 1998) de compostos fenólicos como os flavonoides (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2013).

As concentrações dos flavonoides e tempos utilizados neste ensaio foram baseadas em trabalhos anteriores do nosso grupo de trabalho no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (COELHO *et al.*, 2019; da SILVA *et al.*, 2019). Inicialmente foi realizada uma triagem com os flavonoides e derivados de síntese com o objetivo de avaliar a proliferação e viabilidade de células gliais. Células astrocitárias das linhagens GL-15, C6 e células gliais de culturas primárias enriquecidas de astrócitos foram tratadas com os compostos nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μM e avaliadas após um período de 24 horas. De forma geral, foi observado que o efeito do tratamento de alguns flavonoides e derivados de síntese promoviam mudanças na morfologia e redução da celularidade, quando comparadas ao controle (DMSO).

Através da microscopia de contraste de interferência diferencial, observou-se que as células de GL15, expostas aos flavonoides e derivados de síntese, reduziram a viabilidade celular de forma significativa quando comparado ao controle DMSO 0,1%. Dentre estas moléculas, destacaram-se quanto a redução da viabilidade celular os flavonoides apigenina, crisina e o derivado monoprenilado (7-O-prenilnaringenina), com porcentagem de viabilidade celular marcadamente acentuada, abaixo de 50%, na concentração de 100 μM (Fig. 7). Além disso, foi observado os efeitos da molécula monoprenilada quanto às mudanças morfológicas, como retração do citoplasma e núcleos condensados bem como os efeitos na redução da celularidade promovidos pelos flavonoides apigenina e o derivado sintético diprenilado da naringenina (7,4'-O-diprenilnaringenina) (Fig.8).

As células de glioma murino, apresentaram-se mais resistentes aos efeitos dos flavonoides e derivados de síntese. Houve redução da viabilidade das células C6, com valores próximos de 50%, quando estas foram expostas a concentração de 100 μM dos flavonoides crisina, apigenina e do derivado monoprenilado e de forma mais discreta, porém significativa, após exposição ao flavonoide hesperidina (Fig. 9)

Estes efeitos foram observados pela microscopia, a partir da concentração de 50 μM , após tratamento, com mudanças mais intensas promovidas pelos derivados diprenilado e monoprenilado (7,4'-O-diprenilnaringenina e 7-O-prenilnaringenina, respectivamente), crisina, apigenina e hesperidina na concentração de 100 μM . As células mudaram da morfologia de fenótipo clássico alongado com corpo e núcleo bem característicos, semelhante ao controle DMSO, para o fenótipo de citoplasmas retraídos e redução do tamanho celular (Fig.10), indicativo de mudanças metabólicas celulares associadas à morte celular (WANG *et al.*, 2018).

Já na cultura primária de glia enriquecida de astrócitos, observou-se que os compostos não induziram alta toxicidade nas concentrações testadas e que o flavonoide naringenina e seus derivados de síntese monoprenilado (7-O-prenilnaringenina) e diprenilado (7,4'-O-diprenilnaringenina), promoveram aumento de células metabolizando o MTT, sugerindo proliferação, mesmo em concentrações baixas, como de 1 μM (Fig. 11), efeito observado também nas concentrações de 50 e 100 μM , sem mudanças morfológicas, com exceção da crisina 100 μM que promoveu redução da viabilidade celular (Fig. 10) com valores próximos de 50%. Já na microscopia de contraste diferencial, mudanças na morfologia promovidas pelas moléculas de rhoifolina, apigenina, crisina, naringina e hesperidina são observadas já em 50 μM e com efeitos mais intensos em 100 μM , onde as células apresentam-se com núcleo e citoplasma retraídos e com redução do tamanho celular (Fig.12). Nas três culturas de células astrocíticas, os efeitos observados não foram dose-dependentes.

6.3 - Flavonoides e derivados de síntese são capazes de modular a reatividade astrocitária e sistemas antioxidantes

6.3.1 O flavonoide naringenina e derivados prenilados modulam os níveis de GSH

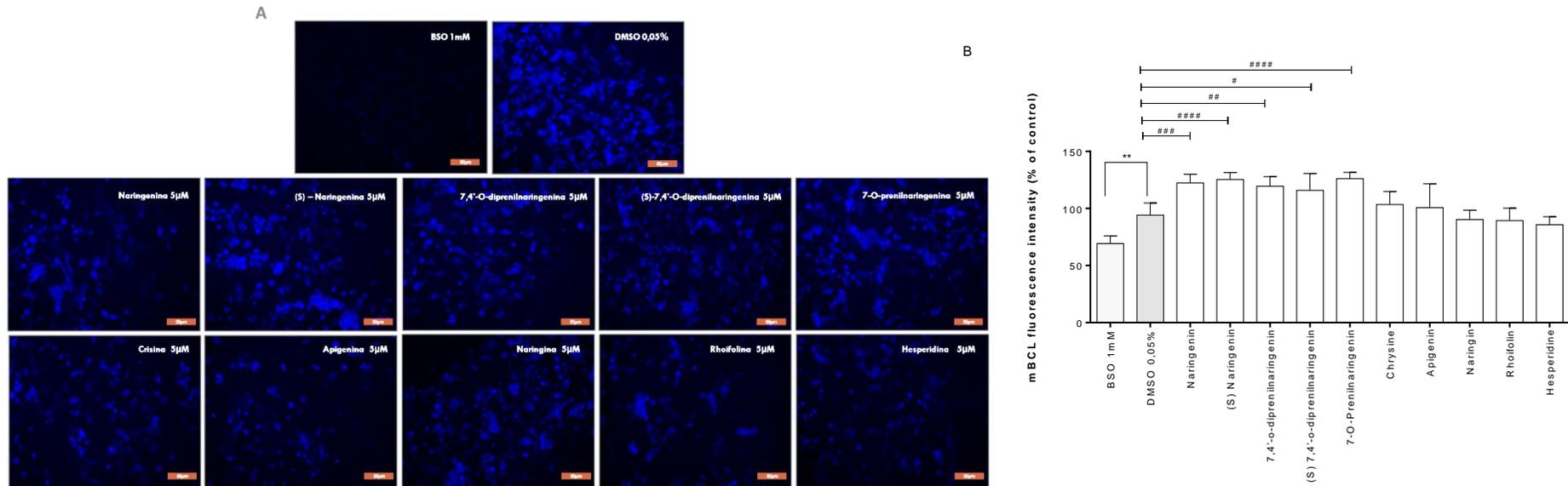


Figura 13 - Efeito dos flavonoides e derivados de síntese em culturas primárias de glia enriquecida de astrócitos na depleção da glutatona após tratamentos. (A) Fotomicrografia de marcação por fluorescência. Foram expostas ao controle DMSO 0,05%, BSO (D,L-buthionine-(S,R)-sulfoximine) 1mM, naringenina, (S) – naringenina, 7,4'-O-diprenilnaringenina, (S)- 7,4'-O-diprenilnaringenina, 7-O-prenilnaringenina, crisina, apigenina, naringina, rhoifolina e hesperidina (5µM) após 24 horas de tratamento. (B) Intensidade de fluorescência dos níveis de glutatona. Objetiva 10X, scale bars = 50. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,05%.

Os resultados apresentados através de microscopia de fluorescência (Fig 13a) demonstraram que houve redução da fluorescência promovida pelo MCB após tratamento com BSO, utilizado como controle positivo, um inibidor da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), (DREW & MINERS, 1984; GRIFFITH & MEISTER, 1979). O monoclorobimano (MCB) é uma sonda primariamente não fluorescente até ser conjugado e que reage prontamente com vários tióis de baixo peso molecular, incluindo na depleção da glutathiona reduzida (GSH) (ISHKAEVA *et al.*, 2022). O veículo DMSO 0,05% (Figura 13b), manteve os níveis basais de glutathiona intracelular quando comparado com o BSO, onde observa-se ausência de fluorescência, indicativo de depleção da glutathiona. Este mesmo efeito foi observado na Fig 13b onde o veículo DMSO 0,05% quando comparado com o BSO, teve efeito de depleção estatisticamente significativa. O flavonoide naringenina e seus derivados de síntese induziram o aumento dos níveis de GSH, de forma significativa (Fig. 13b) na concentração de 5 μ M, após 24 horas de tratamento.

A depleção de GSH inicia uma cadeia de eventos resultantes em dano oxidativo podendo gerar morte celular. Células da glia, principalmente os astrócitos, são participantes importantes nesta via, uma vez que possuem níveis abundantes de GSH (MYTILINEOU, KRAMER & YABUT, 2002). Além disso, a manutenção dos níveis de glutathiona pode fornecer uma alternativa terapêutica para doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (SMEYNE & SMEYNE, 2013). Juntos, esses resultados sugerem efeitos promissores da capacidade antioxidante da naringenina e seus derivados de síntese de manter os níveis de GSH na cultura primária de glia enriquecida de astrócitos, desempenhando um papel importante como agentes neuroprotetores. Nenhuma alteração nos níveis de GSH foi observada nas demais moléculas quando comparadas ao DMSO 0,05%.

6.3.2 - LPS e crisina promovem aumento dos níveis da superóxido dismutase

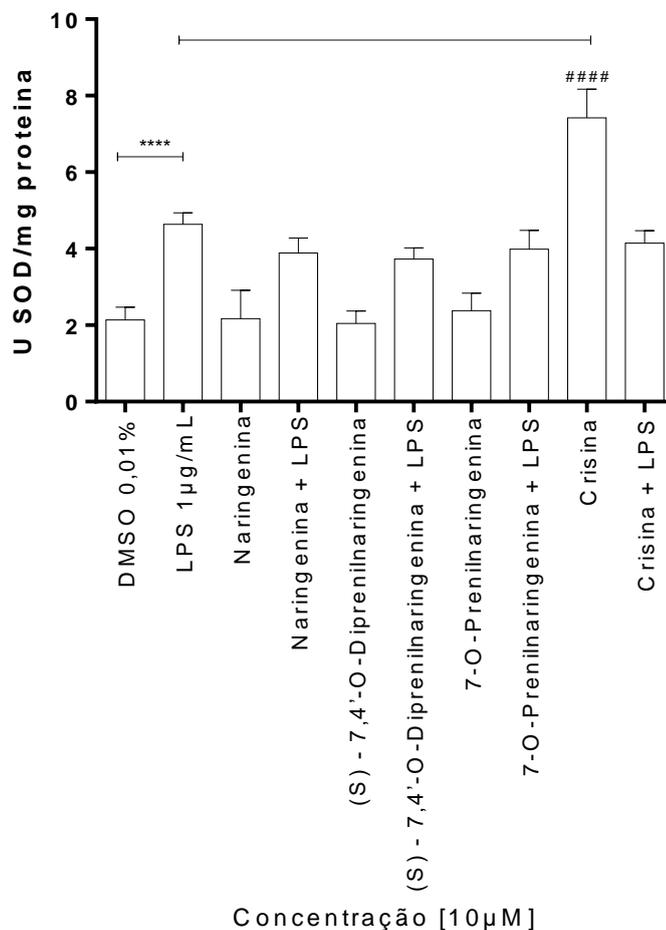


Figura 14 - Atividade total de superóxido dismutase (SOD) em cultura primária de glia enriquecida de astrócitos após tratamentos. Médias e erros padrão de quatro réplicas analisados pelo teste de Kruskal Wallis-ANOVA seguido de pós-teste de Dunn. **** $p < 0,0001$ quando comparados com o DMSO 0,01%; ##### $p \leq 0,0001$ quando comparado com o controle LPS 1 μg/mL.

A atividade da superóxido dismutase total (SOD) foi avaliada para investigar sua associação com o potencial antioxidante dos flavonoides e derivados prenilados. Para isto foi utilizado uma densidade celular de 12 milhões por tratamento, de células da cultura primária de glia enriquecida de astrócitos que foram submetidas ao estímulo inflamatório com LPS (1 μg/mL) por 24 horas e após este período, feito o tratamento com as moléculas de flavonoides (10 μM) por mais 24h.

Os homogenatos celulares foram submetidos ao teste do NBT com subsequente quantificação de proteínas (descrito em materiais e métodos). O LPS promoveu maior atividade SOD total induzida em comparação com o controle negativo

DMSO 0,01%, apresentando-se de forma significativa. O Lipopolissacarídeo é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias, agonista do receptor toll-like 4 (TLR4) que ativa fatores de transcrição na produção de citocinas como TNF, IL-1, IL-6, IL-8 (FARHANA & KHAN, 2021) além de dano celular devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, portanto, bem descrito como modelo de neuroinflamação (ALSHEHRI & IMAM, 2021; HSU & WEN, 2002).

Além disso as moléculas isoladas: naringenina, (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina e 7-O-prenilnaringenina, tiveram resultados similares ao controle DMSO e quando comparadas ao LPS não promoveram aumento da SOD. Em contrapartida, a crisina aumentou de forma significativa os níveis de SOD quando comparado ao LPS, demonstrando capacidade antioxidante através do aumento do número de enzimas, efeito também demonstrado por Rashno et al., (2019).

6.3.3 Flavonoides e derivados modulam diferencialmente a produção de óxido nítrico

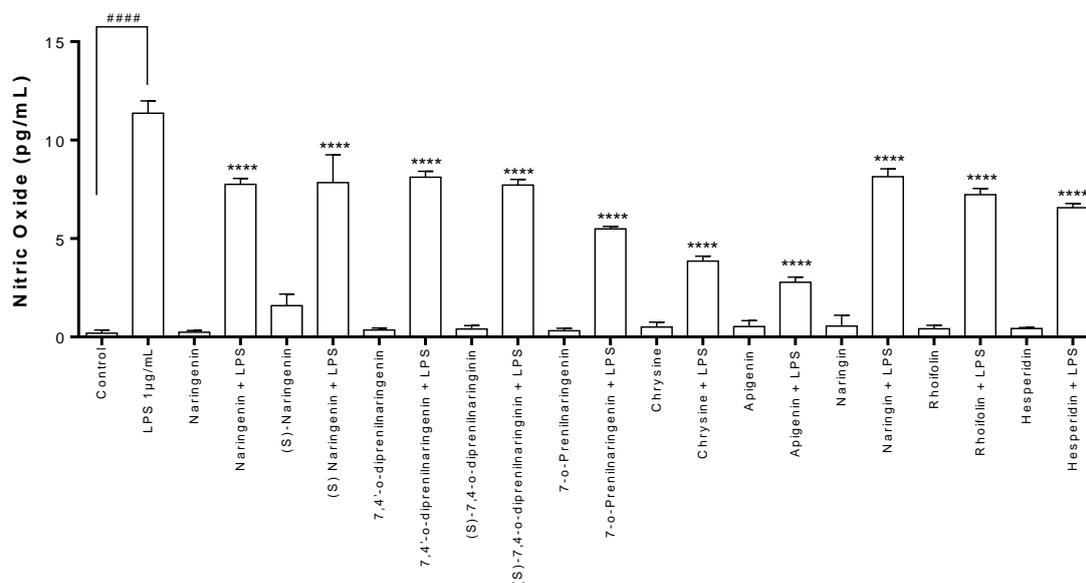


Figura 15 - Níveis de nitrito, forma estável de óxido nítrico (NO) determinados pela reação de Griess no sobrenadante de culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos. Foram considerados resultados de 3 experimentos independentes analisados pelo teste de Kruskal Wallis-ANOVA seguido de pós-teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ quando comparados com o LPS 1µg/mL; # $p \leq 0,0001$ quando comparado com o controle DMSO 0,01%.

As culturas foram tratadas no primeiro dia com LPS (1 µg/mL) por 24 h e após este período, foram tratadas com as moléculas do estudo (10µM) por 24h. O tratamento com LPS induziu um aumento significativo de NO em comparação com o controle (DMSO 0,01%). Este aumento de óxido nítrico promovido pelo LPS foi significativamente reduzido pelos tratamentos de cada moléculas de flavonoides e derivados de síntese no tratamento concomitante, comparado ao estímulo inflamatório isolado. Além disso, foi possível demonstrar que as moléculas em tratamento isolado, não induziram a produção de óxido nítrico de forma significativa em comparação com o estímulo inflamatório LPS (Fig.15) Uma vez que microglia e principalmente astrócitos expressam iNOS, enzima que permite a produção de óxido nítrico mediante condições inflamatórias, a astrogliose reativa pode contribuir para o estresse oxidativo através dos altos níveis de óxido nítrico (SHENG *et al.*, 2011), como demonstrados neste trabalho.

6.3.4 Flavonoides e derivados modulam diferencialmente a morfologia de células da glia em culturas de glia enriquecidas de astrócitos

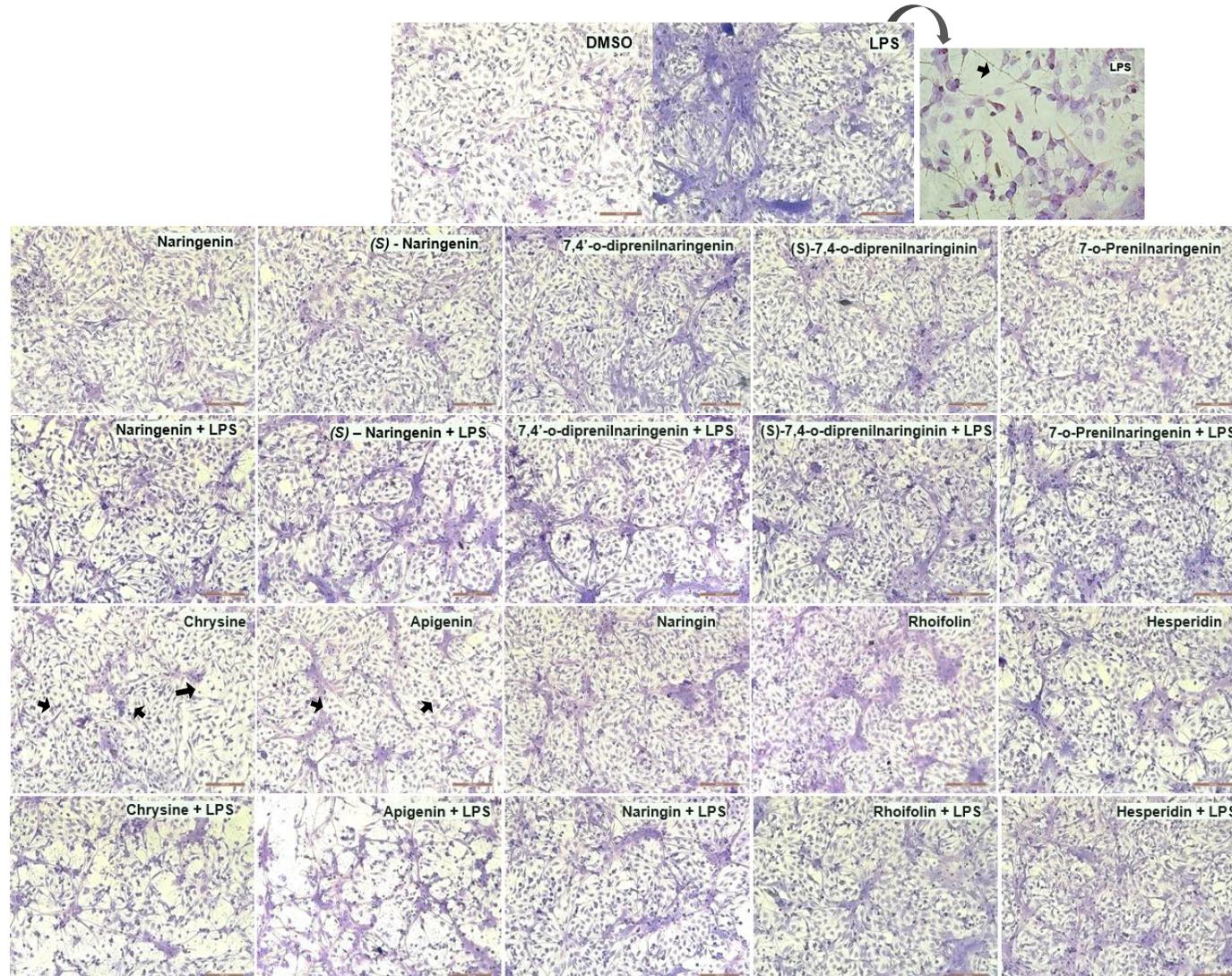


Figura 16 - Fotomicrografias evidenciando a morfologia de células após coloração de Rosenthal em culturas primárias de células glias enriquecidas de astrócitos após tratamentos. Cultura de células expostas ao controle DMSO 0,05%, LPS 1 µg/mL e flavonoides e derivados de síntese isolado e em cotratamento (10 µM) após 24 horas de tratamento. Objetiva 10X, scale bars = 200 µm. Setas pretas indicam alterações morfológicas.

Para investigar as alterações morfológicas na cultura primária de glia enriquecida de astrócitos em resposta ao estímulo inflamatório com o LPS 1µg/mL e subsequentes tratamentos com os flavonoides e derivados de síntese, foi realizado a coloração destas células com o corante pancrômico Rosenfeld. No primeiro dia deste experimento, foi realizado o estímulo inflamatório com o LPS e após 24h feito o tratamento com as moléculas de flavonoides e derivados de síntese por mais 24h.

No tratamento com o LPS, observou-se a coloração do citoplasma em roxo e núcleos em roxo intenso, aumento dos prolongamentos das células que se apresentaram mais fibrosas e com prolongamentos ramificados, quando comparados ao controle DMSO 0,01%, indicativo de reatividade astrocitária. Essas alterações também são vistas no tratamento concomitante dos flavonoides com o LPS, porém de forma menos intensa do estímulo inflamatório isolado. Nos tratamentos com os flavonoides apigenina e crisina, houve mudanças na manutenção do corpo celular e celularidade, onde as células apresentaram-se de forma reduzida, com retração do núcleo e aumento de processos fibrosos (Fig.16), quando comparada ao controle DMSO, de fenótipo plano e poligonal distribuídos homogeneamente sobre a densa camada astrogliial.

Nos tratamentos isolados com as moléculas, foi possível observar a manutenção da morfologia celular. Não foram observados vacúolos citoplasmáticos nos tratamentos e em todos os tratamentos concomitantes, as moléculas modularam a não progressão de alterações morfológicas promovidas pelo LPS, nas alterações celulares, preservando a morfologia e celularidade mais próximas do controle.

7 DISCUSSÃO

Embora a etiologia das doenças neurodegenerativas permaneça pouco clara, evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo, e consequente neuroinflamação, desempenha um papel importante na fisiopatologia dessas doenças (CAROCCI *et al.*, 2018). Com o objetivo de investigar as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias de compostos polifenólicos e derivados de síntese prenilados com ácido seneciico, o presente trabalho foi desenvolvido a fim de avaliar estas duas propriedades, prospectando os flavonoides como agentes farmacológicos adjuvantes em modelo *in vitro* de neuroinflamação.

Para tanto, foi realizado um screening *cell free* de atividade antioxidante, em seguida investigou-se os efeitos das moléculas na resposta astrocitária e na modulação da neuroinflamação de culturas primárias de ratos *Wistar* neonatos (Protocolo nº 6731220818 (ID 000058), submetidos ou não ao estímulo inflamatório com LPS.

Flavonoides fazem parte de um grande grupo de polifenóis bioativos, componentes da dieta humana e importantes antioxidantes e antiinflamatórios naturais (CHEN *et al.*, 2005; MALEKI, CRESPO & CABANILLAS, 2019). A naringenina é uma das flavanonas mais abundantes em frutas cítricas e dentre suas diversas propriedades, destaca-se pela capacidade antioxidante (JABBARI & JABBARI, 2016). Até o momento, vários métodos foram desenvolvidos para medir a capacidade antioxidante de compostos bioativos naturais, dentre eles o DPPH. O ensaio envolvendo a eliminação do radical livre DPPH é um dos mais utilizados devido ao seu baixo custo, rapidez e acessibilidade para medição de propriedades antioxidantes de substâncias e extratos fenólicos (BLOIS, 1958; BALIYAN *et al.*, 2022). A naringina e sua aglicona naringenina possuem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (TRIPOLI *et al.*, 2007). A naringina apresentou menor atividade de eliminação do radical DPPH do que a naringenina (Fig. 6). Essa diferença de atividade antioxidante entre as moléculas possivelmente é devido a porção glicosídica, presente na posição 7 do anel A da naringina, que resulta em impedimento estérico do grupo de eliminação (ALAM *et al.*, 2014). Os derivados prenilados apresentaram capacidade de eliminação do DPPH similar ao da naringenina, com destaque para a molécula diprenilada (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina que apresentou similaridade com o trolox.

Prenilflavonoides possuem propriedades redutoras do DPPH (JUNG *et al.*, 2008), demonstrando serem até mais potentes do que seus flavonoides originais, sem o grupamento prenílico (MUKAI, 2018). Em contrapartida, algumas moléculas que apresentam na sua estrutura a dupla ligação C2-C3 presente nas flavonas: apigenina, crisina e rhoifolina, geralmente descrita na literatura como um elemento estrutural que aumenta a capacidade de eliminação de radicais livres (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996), os resultados obtidos (Fig.6) demonstraram atividade de eliminação de DPPH muito baixa, em comparação com trolox. Segundo Pannala *et al.*, (2001) e Burda & Oleszek (2001), flavonas que não possuem o grupo catecol em sua estrutura também são relativamente instáveis e fracas sequestradores de radicais livres.

Além disso, de forma geral, a hesperidina esboçou capacidade antioxidante com maior sequestro do radical livre DPPH dentre os flavonoides estudados (Fig. 6) apresentando-se como pouco significativo ou não significativo na concentração de 1 μ M e 10 μ M, respectivamente, devido à similaridade ao trolox. Esta forte atividade da hesperidina no sequestro do DPPH também foi demonstrada por Al-Rikabi *et al.*, (2020) e Wilmsen, Spada & Salvador (2005) em concentrações similares às deste estudo.

O contraste de atividade eliminadora do DPPH entre os flavonoides glicosídicos naringina, rhoifolina e hesperidina pode ser justificado devido a porção glicosídica. Segundo Xiao (2017), moléculas glicosiladas tem menor quantidade de grupos fenólicos livres disponíveis, com atividade antioxidante reduzida ao passo que aumenta as porções glicosídicas, posição e estrutura dos açúcares em testes *in vitro*, como o DPPH. Em contrapartida, a glicosilação de flavonoides, em meios biológicos, melhora a estabilidade dessas moléculas uma vez que há o bloqueio dos grupos fenólicos, susceptíveis a oxidação ou ataque de radicais livres (SLÁMOVÁ, KAPEŠOVÁ & VALENTOVÁ, 2018). Uma desvantagem do ensaio DPPH é a inacessibilidade estérica, ou seja, moléculas estruturalmente desfavoráveis têm menores chances de acessar o radical livre, resultando em menores valores de eliminação do DPPH (APAK *et al.*, 2007).

Também foi analisado a viabilidade e proliferação celular através da mensuração das desidrogenases mitocondriais. Quando as células de GL-15 e C6 foram tratadas por 24 horas com os flavonoides e derivados sintéticos, observou-se redução da viabilidade a partir de 1 μ M com efeitos mais pronunciados nas

concentrações de 50 e 100 μM além de mudanças na morfologia celular, observadas através da microscopia por contraste diferencial (Fig. 8 e 10). Wang *et al.*, (2018) e Coelho *et al.*, (2016) demonstraram que flavonoides como crisina e apigenina, possuem alta capacidade antiproliferativa em células astrocíticas humanas (U251 e U87) e murina (C6), além de apresentarem efeitos morfogênicos. A condensação da cromatina (Fig.10) também é um efeito promovido por outros flavonoides como a hesperidina, em concentrações de 100 μM em células proliferativas (PARK *et al.*, 2007). Segundo Santos e colaboradores (2011), essas mudanças morfológicas promovidas pelos flavonoides, são característicos de processos pró apoptóticos onde as células apresentam retração do citoplasma e núcleos condensados bem como redução na celularidade.

Estima-se que a substituição de grupos prenil em flavonoides, aumenta a relação de hidrofobicidade da molécula o que acarreta o maior acúmulo intracelular e conseqüentemente maior efeito tóxico (TERAO & MUKAI, 2014). O flavonoide naringenina, exibiu menos efeitos tóxicos na linhagem C6 na mesma concentração (100 μM) do que seu derivado monoprenilado 7-O-prenilnaringenina (Fig.9). Stompor; Uram e Podgórski, (2017) compararam a atividade da naringenina e 8-prenilnaringenina e concluíram que a citotoxicidade promovida pelo flavonoide prenilado era maior que o seu flavonoide de origem. As linhagens celulares são frequentemente usadas como modelo de estudo, pois são mais fáceis de cultivar, rápidas de manipular e custam menos. Alguns parâmetros analisados podem se complementar comparando-se uma cultura primária e uma linhagem imortalizada (GALLAND *et al.*, 2019) e para tanto foi utilizada a cultura primária de glia enriquecida de astrócitos derivadas de ratos neonatos *Wistar* a fim de comparar os achados de viabilidade celular. Esta cultura é de forma geral, de fácil preparação e os astrócitos podem ser obtidos de todas as regiões do SNC e em qualquer idade embora o mais desejável seja em roedores de 2 a 3 dias pós-natal, no momento ideal da astrogênese (LIM & BOSCH, 1990).

Neste trabalho foi demonstrado que na cultura primária enriquecida de astrócito houve um aumento da viabilidade celular (Fig.11), que pode estar correlacionada à proliferação astrocíticas (HAMBY & SOFRONIEW, 2010). Houve redução da viabilidade celular e mudanças significativas na morfologia celular quando as

células foram submetidas apenas aos tratamentos de altas concentrações (100 μM) com crisina e apigenina. Estes resultados reiteram a alta capacidade morfogênica dos flavonoides e derivados prenilados.

Além destes, muitos modelos *in vitro* têm sido utilizados para o estudo celular e avaliação dos fatores que levam ao estresse oxidativo e a neuroinflamação. A cultura primária de glia enriquecida de astrócitos, já bem estabelecida no LabNq de acordo com o protocolo de Cookson & Pentreath (1994) modificado, foi utilizada neste trabalho como modelo experimental a fim de investigar ação antiinflamatória dos flavonoides e derivados de síntese induzido por lipopolissacarídeo (CZAPSKI *et al.*, 2007) de *Escherichia coli* e ação antioxidante através de avaliações enzimáticas.

Os astrócitos são as principais células da glia e desempenham papéis críticos no SNC. Participam ativamente de várias funções como controle osmótico, permeabilidade da barreira hemato encefálica e papel significativo na manutenção dos antioxidantes (SIMARD & NEDERGAARD, 2004; OWENS, BECHMANN & ENGELHARDT, 2008; WILSON, 1997; LIDDELL *et al.*, 2010). Mudanças redox aliadas a desregulação nos mecanismos antioxidantes levam ao estresse oxidativo e neuroinflamação (SHENG *et al.*, 2013; TAYLOR, MAIN & CRACK, 2013), que estão correlacionados a astrogliose reativa. A astrogliose reativa é um conjunto de alterações que ocorrem nos astrócitos em resposta a lesões ou doenças do SNC que se traduzem através de mudanças bioquímicas, morfológicas e na desregulação dos mecanismos antioxidantes (MOULSON *et al.*, 2021).

Dentre esses mecanismos antioxidantes, a glutathiona que é um tripeptídeo com grupo tiol na sua estrutura, é considerada o antioxidante de baixo peso molecular mais abundante no encéfalo (RAE & WILLIAMS, 2017). Neste trabalho, foi possível estudar os efeitos de flavonoides e derivados prenilados na depleção da GSH através da utilização do monoclorobimano, modelo bem estabelecido para análise da glutathiona em células gliais (CHATTERJEE *et al.*, 1999).

Uma vez que os astrócitos produzem sua própria glutathiona e fornecem precursores para a síntese de GSH aos neurônios vizinhos (AOYAMA, 2021), a depleção da GSH no astrócito está implicada no controle do estresse oxidativo (SALIM, 2017). Na figura 13 foi demonstrada a ausência de fluorescência no

tratamento com o BSO, inibidor da GSH, e aumento expressivo nos níveis deste antioxidante quando as células da cultura primária de glia enriquecida de astrócitos foram tratadas com a naringenina e seus derivados prenilados. Os demais flavonoides parecem não aumentar os níveis de GSH intracelular na concentração testada comparado ao controle DMSO 0,05%. Um estudo recente demonstrou que alguns flavonoides têm capacidade de modular os níveis de glutathiona através do influxo de cisteína ou através da modulação da γ -GCS, limitantes para a síntese de GSH (UI HASSAN *et al.*, 2022) uma vez que glutamato e glicina estão em concentrações intracelulares relativamente altas (MAHER, 2009). Para confirmar esta hipótese de modulação da γ -GCS estudos complementares seriam necessários.

As espécies reativas são importantes para o funcionamento fisiológico do cérebro (BECKHAUSER, FRANCIS-OLIVEIRA & DE PASQUALE, 2016) e os astrócitos participam ativamente da regulação redox produzindo antioxidantes como GSH e SOD, liberando-os no microambiente (MC BEAN, 2018). Para este ensaio foram escolhidas 04 moléculas para a investigação enzimática da superóxido dismutase, através do tratamento isolado e/ou concomitante com o estímulo inflamatório LPS. Na figura 14 foi demonstrado o aumento da SOD perante estímulo inflamatório. O estudo de WANG *et al.*, (2004) demonstrou que após estímulo com LPS, células gliais aumentavam a produção de espécies reativas. As moléculas de flavonoides e derivados de síntese preniladas não induziram o aumento do LPS, porém não tiveram efeitos significativos quando em tratamento concomitante comparado ao LPS, mantendo os níveis basais de SOD quando comparados ao controle DMSO. Isto pode ser um indicativo que o potencial antioxidante destas moléculas: naringenina, (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina e 7-O-prenilnaringenina sejam por outras vias que não a superóxido dismutase e sim através da modulação dos níveis de GSH, como demonstrado na figura 12b.

Por outro lado, o flavonoide crisina, induziu de forma significativa, quando comparado ao LPS, o aumento substancial da SOD (Fig. 14). Crisina, em tratamento isolado, não induziu produção de óxido nítrico (Fig.15). Isso denota que o aumento da SOD, neste ensaio, após tratamento com crisina, não está vinculado ao aumento de NO, mas que pode estar correlacionado ao aumento de outras espécies reativas que não foram estudadas neste trabalho ou ativação

de uma das isoformas da SOD. Tendo em vista que a SOD possui 3 isoformas que estão em locais diferentes na célula, a sua ativação após alguns tratamentos, pode ser distinta. Ishihara *et al.*, (2015) demonstraram que não houve alterações nos níveis de mRNA de SOD2 após o tratamento com LPS durante os experimentos em células astrocíticas. Além disso, os níveis de SOD 3 são maiores em astrócitos do que em neurônios e microglias. Em contrapartida, Iitsuka *et al.*, (2012) demonstraram que a estimulação por LPS aumentou a atividade da SOD no meio, analisados por RT-PCR. Uma vez que a SOD na superfície celular é liberada no meio por estimulação de LPS (provavelmente a SOD-3, por ser a isoforma extracelular), a síntese proteica desta enzima aumenta para recuperar a atividade da superfície celular.

Como o ensaio do NBT não distingue as isoformas de SOD, devido a sua heterogeneidade, pode acontecer uma ativação diferencial desta enzima após os tratamentos com os flavonoides e derivados prenilados. Estudos complementares são necessários para esclarecer esta hipótese.

Astrócitos expressam todas as três isoformas de NOS, incluindo a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ativada por estímulos inflamatórios (GIBSON, COUGHLAN & MURPHY, 2005). Agonistas do receptor TLR4, como o LPS, induz a iNOS e subsequente formação de óxido nítrico (NO), isto é particularmente evidenciado em astrócitos de ratos e camundongos (SAHA & PAHAN, 2006). Além disso, astrócitos reativos liberam neurotoxinas como: espécies reativas de oxigênio, o próprio óxido nítrico, metaloproteinases e citocinas pró inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LINDHOUT *et al.*, 2021) contribuindo ainda mais para a exacerbação da resposta inflamatória astrocítica.

Neste trabalho foi demonstrado que o tratamento com o LPS induziu o aumento do óxido nítrico. Em contrapartida, houve redução significativa do óxido nítrico quando em tratamento concomitante com os flavonoides e derivados prenilados (Fig.15). Diversos estudos demonstram que flavonoides e flavonoides prenilados possuem capacidade de reduzir o NO, incluindo em tratamentos concomitantes (BALEZ *et al.*, 2016; JO *et al.*, 2019; DE ALMEIDA *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2019; LEE, KIM & RYU, 2005; FRATTARUOLO *et al.*, 2019; HIRANAGA *et al.*, 2016). Apesar do NO ser um neuromediador importante em condições fisiológicas, em estados disfuncionais, a sua combinação com outras

espécies reativas como o superóxido gera o peroxinitrito (ONOO^-), que está associado a diversas condições patológicas, incluindo neuroinflamação e doenças neurodegenerativas (JUSTO & SUEMOTO, 2022; LIY *et al.*, 2021; BROOM *et al.*, 2006). Esta redução do NO promovida pelos flavonoides, pode ser devido a reações de neutralização do peroxinitrito através da doação de elétrons (POLLARD *et al.*, 2006). Portanto a inibição da produção excessiva do NO pode ser um mecanismo neuroprotetor tendo em vista que tem papel crucial nos mecanismos de desenvolvimento e manutenção das doenças neurodegenerativas.

Para melhor caracterizar a morfologia celular foi utilizada a coloração de Rosenfeld que é uma técnica bem estabelecida para análise da morfologia celular de células gliais (ROSENFELD, 1947; SILVA *et al.*, 2008). A hipertrofia astrocitária, aumento do número celular e acúmulo de filamentos como GFAP (WILHELMSSON *et al.*, 2006; HOL & PEKNY, 2015) são característica da astrogliose reativa e fatores pró inflamatórios como indução da iNOS promovidos pelo LPS, estão implicados em mudanças morfológicas (RODGERS *et al.*, 2020). Neste trabalho, a coloração de Rosenfeld foi utilizada para observar a capacidade dos flavonoides e derivados de síntese em induzir alterações morfológicas na cultura primária enriquecida de astrócitos.

Nossos achados demonstraram que o tratamento com o estímulo inflamatório LPS promoveu alterações morfológicas (Fig.16) como aumento da hipertrofia dos astrócitos e núcleos condensados, indicativos de astrogliose reativa (BURDA & SOFRONIEW, 2014). Algumas alterações morfológicas similares ao tratamento com o LPS foram observadas quando as células da cultura primária foram tratadas isoladamente com apigenina e crisina. Segundo Silva *et al.*, (2008) e Santos *et al.*, (2011), alguns flavonoides como a rutina, crisina e apigenina são capazes de gerar mudanças morfológicas em células gliais.

Um estudo anterior do nosso grupo de trabalho evidenciou que flavonoides em tratamento concomitante atenuaram a progressão das mudanças morfológicas, reduzindo os efeitos inflamatórios do LPS nas células gliais (DOURADO *et al.*, 2020). Estudos que demonstram a capacidade de modulação de células astrocitárias quanto a mudanças morfológicas promovidas por compostos fenólicos que contenham o grupo prenil em sua estrutura, não foram

encontrados. Em contrapartida, o estudo de Henneman *et al.*, (2018) apontou a capacidade de prenilflavonoides como o xanthohumol em preservar a morfologia celular em outros modelos de estudo, como o de células granulares do giro dentado em um estudo sobre epilepsia. Além disto, o estudo de Vafeiadou *et al.*, (2009) demonstrou redução da expressão de TNF- α , iNOS e NO em células gliais ativadas por LPS e na modulação morfológica da rede de astrócitos quando as células foram tratadas com naringenina. Devido ao grupamento prenil garantir maior solubilidade para as moléculas de flavonoides e, portanto, maior permeabilidade pelas membranas lipofílicas da célula (BOOZARI, SOLTANI & IRANSHAHI, 2019), nossos achados sugerem que os derivados prenilados evitaram o avanço de alterações morfológicas promovidas pelo LPS nas células em tratamento concomitante.

9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que:

- Hesperidina e (S)-7,4'-O-diprenilnaringenina apresentaram maior potencial antioxidante, naringenina e demais derivados prenilados apresentaram atividade antioxidante moderada, em comparação ao trolox na análise do potencial de eliminação do radical livre DPPH•;
- O derivado monoprenilado da naringenina, 7-O-prenilnaringenina, apresentou maior potencial citotóxico para as células astrocíticas proliferativas de GL15 (humanas) e C6 (murinos), no entanto, não induziu toxicidade e mudanças morfológicas para as células da cultura primária enriquecida de astrócitos;
- Os flavonoides e derivados de síntese apresentaram potencial anti-inflamatório e antioxidante caracterizado pela redução de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico;
- A naringenina e seus derivados de síntese apresentaram ação antioxidante com potencial modulador da GSH;
- Crisina e apigenina apresentaram potencial morfogênico e as demais moléculas deste estudo preservaram a morfologia astrocítica em tratamento isolado além de promoverem reversão das mudanças morfológicas relacionadas a processos neuroinflamatórios promovidos pelo LPS, observados na microscopia de contraste de interferência diferencial, quando em tratamento isolado.
- O LPS induziu estresse oxidativo, a crisina induziu o aumento do número de enzimas superóxido dismutase e demais moléculas não interferiram nos níveis enzimáticos.

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo, através da redução de radicais livres e de moduladores inflamatórios como o óxido nítrico, modulação de componentes antioxidantes e através da redução da astrogliose reativa induzida pelo lipopolissacarídeo, permitem confirmar a hipótese de que flavonoides e derivados de síntese prenilados possuem capacidade antineuroinflamatória e

antioxidante. No entanto, mais estudos são necessários a fim de compreender melhor quais são os mecanismos de ação dos flavonoides e derivados de síntese no modelo de neuroinflamação.

10. REFERÊNCIAS

1. Aborode, A. T., Pustake, M., Awuah, W. A., Alwerdani, M., Shah, P., Yarlagadda, R., ... & Alexiou, A. (2022). Targeting oxidative stress mechanisms to treat Alzheimer's and Parkinson's disease: a critical review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
2. Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 46(6), 957-967.
3. Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1140-1149
4. Ahmedy, O. A., Abdelghany, T. M., El-Shamarka, M. E., Khattab, M. A., & El-Tanbouly, D. M. (2022). Apigenin attenuates LPS-induced neurotoxicity and cognitive impairment in mice via promoting mitochondrial fusion/mitophagy: role of SIRT3/PINK1/Parkin pathway. *Psychopharmacology*, 1-15.
5. Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., & Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417.
6. Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia—more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675-677.
7. Al-Rikabi, R., Al-Shmgani, H., Dewir, Y. H., & El-Hendawy, S. (2020). In vivo and in vitro evaluation of the protective effects of hesperidin in lipopolysaccharide-induced inflammation and cytotoxicity of cell. *Molecules*, 25(3), 478.
8. Alshehri, S., & Imam, S. S. (2021). Rosinidin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Rats: Possible Mechanisms of Action Include Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects. *Biomolecules*, 11(12), 1747.
9. Aoyama, K. (2021). Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 5010.
10. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
11. Bai, J., Li, S., Wu, G., Ma, L., Li, C., Liu, H., & Zhang, P. (2019). Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced activation of microglia cells. *Cellular and Molecular Biology*, 65(5), 38-42.
12. Bailey, H. H. (1998). LS, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chemico-biological interactions*, 111, 239-254.
13. Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S. S., Lum, J. S., Wu, Y., ... & Ooi, L. (2016). Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 6(1), 1-16.
14. Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by

- DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326.
15. Bardestani, A., Ebrahimpour, S., Esmaeili, A., & Esmaeili, A. (2021). Quercetin attenuates neurotoxicity induced by iron oxide nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-33.
 16. Barreto, S. M. A., Silva A. B. M. da, Dutra M. da C. P., Bastos D. C., Carvalho A. J. de B. A., Viana, A. C., Narain N., Lima, M. dos S. (2023). Effect of commercial yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on fermentation metabolites, phenolic compounds, and bioaccessibility of Brazilian fermented oranges, *Food Chemistry*, 408(1), 135121.
 17. Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology*, 11(9), 372-377.
 18. Beckhauser, T. F., Francis-Oliveira, J., & De Pasquale, R. (2016). Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: Supplementary issue: Brain plasticity and repair. *Journal of experimental neuroscience*, 10, JEN-S39887.
 19. Benarroch, E. E. (2005, October). Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 80, No. 10, pp. 1326-1338). Elsevier.
 20. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839), 370-371.
 21. Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., ... & Kuźma-Kozakiewicz, M. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Scientific reports*, 12(1), 1-11.
 22. Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
 23. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
 24. Bocchini, V., Beccari, T., Arcuri, C., Bruyere, L., Fages, C., & Tardy, M. (1993). Glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA exhibit mosaic expression in a glioblastoma multiform cell line of clonal origin. *International journal of developmental neuroscience*, 11(4), 485-492.
 25. Boozari, M., Soltani, S., & Iranshahi, M. (2019). Biologically active prenylated flavonoids from the genus *Sophora* and their structure–activity relationship—A review. *Phytotherapy Research*, 33(3), 546-560.
 26. Bourgognon, J. M., Spiers, J. G., Robinson, S. W., Scheiblich, H., Glynn, P., Ortori, C., ... & Steinert, J. R. (2021). Inhibition of neuroinflammatory nitric oxide signaling suppresses glycation and prevents neuronal dysfunction in mouse prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(10), e2009579118.
 27. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
 28. Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3289-3303.

29. Broom, L., Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Davis, J. B., Medhurst, A. D., & Dexter, D. T. (2011). Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 633-640.
30. Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229-248.
31. Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
32. Carocci, A., Catalano, A., Sinicropi, M. S., & Genchi, G. (2018). Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron. *Biometals*, 31(5), 715-735.
33. Carroll, M. C., Girouard, J. B., Ulloa, J. L., Subramaniam, J. R., Wong, P. C., Valentine, J. S., & Culotta, V. C. (2004). Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 5964-5969.
34. Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., & Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine*, 25(2), 77-95.
35. Caruso, G., Godos, J., Privitera, A., Lanza, G., Castellano, S., Chillemi, A., ... & Grosso, G. (2022). Phenolic acids and prevention of cognitive decline: Polyphenols with a neuroprotective role in cognitive disorders and Alzheimer's disease. *Nutrients*, 14(4), 819.
36. Chatterjee, S., Noack, H., Possel, H., Keilhoff, G., & Wolf, G. (1999). Glutathione levels in primary glial cultures: Monochlorobimane provides evidence of cell type-specific distribution. *Glia*, 27(2), 152-161.
37. Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L. F., Kwon, H., Yi, S., ... & Gan, L. (2005). SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40364-40374.
38. Chen, X., Yin, O. Q., Zuo, Z., & Chow, M. S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical research*, 22(6), 892-901.
39. Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., ... & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell proliferation*, 53(3), e12781.
40. Choi, J., Rees, H. D., Weintraub, S. T., Levey, A. I., Chin, L. S., & Li, L. (2005). Oxidative modifications and aggregation of Cu, Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11648-11655.
41. Chtourou, Y., Kamoun, Z., Zarrouk, W., Kebieche, M., Kallel, C., Gdoura, R., & Fetoui, H. (2016). Naringenin ameliorates renal and platelet purinergic signalling alterations in high-cholesterol fed rats through the suppression of ROS and NF- κ B signaling pathways. *Food & function*, 7(1), 183-193.
42. Coelho, P. L., Oliveira, M. N., da Silva, A. B., Pitanga, B. P., Silva, V. D., Faria, G. P., ... & Costa, S. L. (2016). The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates

- the inflammatory profile of glioma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 27(10), 960-969.
43. Cookson, M. R., & Pentreath, V. W. (1994). Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxicology in vitro*, 8(3), 351-359.
 44. Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L. B., Krems, B., & Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23469-23472.
 45. Czapski, G. A., Cakala, M., Chalimoniuk, M., Gajkowska, B., & Strosznajder, J. B. (2007). Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *Journal of neuroscience research*, 85(8), 1694-1703.
 46. DA SILVA, Alessandra Bispo et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. *Brain, behavior, and immunity*, 2019.
 47. de Almeida, M. M. A., Souza, C. D. S., Dourado, N. S., da Silva, A. B., Ferreira, R. S., David, J. M., ... & Costa, S. L. (2020). Phytoestrogen agathisflavone ameliorates neuroinflammation-induced by LPS and IL-1 β and protects neurons in cocultures of glia/neurons. *Biomolecules*, 10(4), 562.
 48. Desagher, S., Glowinski, J., & Premont, J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2553-2562.
 49. Di Pietro, V., Yakoub, K. M., Caruso, G., Lazzarino, G., Signoretti, S., Barbey, A. K., ... & Amorini, A. M. (2020). Antioxidant therapies in traumatic brain injury. *Antioxidants*, 9(3), 260.
 50. Dourado, N. S., Souza, C. D. S., De Almeida, M. M. A., Bispo da Silva, A., Dos Santos, B. L., Silva, V. D. A., ... & Costa, S. L. (2020). Neuroimmunomodulatory and neuroprotective effects of the flavonoid apigenin in in vitro models of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 119.
 51. Drew, R., & Miners, J. O. (1984). The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochemical pharmacology*, 33(19), 2989-2994.
 52. Dringen, R., Pfeiffer, B., & Hamprecht, B. (1999). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *Journal of Neuroscience*, 19(2), 562-569.
 53. Drummond, N. J., Davies, N. O., Lovett, J. E., Miller, M. R., Cook, G., Becker, T., ... & Kunath, T. (2017). A synthetic cell permeable antioxidant protects neurons against acute oxidative stress. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
 54. Du, F., Yu, Q., Kanaan, N. M., & Yan, S. S. (2022). Mitochondrial oxidative stress contributes to the pathological aggregation and accumulation of tau oligomers in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*.
 55. Eklund, B. I., Edalat, M., Stenberg, G., & Mannervik, B. (2002). Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Analytical biochemistry*, 309(1), 102-108.
 56. Farhana, A., & Khan, Y. S. (2021). *Biochemistry, lipopolysaccharide*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

57. Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*, 28(3), 138-145.
58. Ferreira, R. S., Teles-Souza, J., dos Santos Souza, C., Pereira, É. P., de Araújo, F. M., da Silva, A. B., ... & da Silva, V. D. (2021). Rutin improves glutamate uptake and inhibits glutamate excitotoxicity in rat brain slices. *Molecular Biology Reports*, 48(2), 1475-1483.
59. Figueira, I., Garcia, G., Pimpão, R. C., Terrasso, A. P., Costa, I., Almeida, A. F., ... & Santos, C. N. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.
60. Fischer, R., & Maier, O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
61. Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1-12.
62. Frattaruolo, L., Carullo, G., Brindisi, M., Mazzotta, S., Bellissimo, L., Rago, V., ... & Cappello, A. R. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L.(licorice) leaf phytocomplexes: Identification of licoflavanone as a modulator of NF-κB/MAPK pathway. *Antioxidants*, 8(6), 186.
63. Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S. S., Gonçalves, C. A., & Leite, M. C. (2019). Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochemistry international*, 131, 104538.
64. Gibson, C. L., Coughlan, T. C., & Murphy, S. P. (2005). Glial nitric oxide and ischemia. *Glia*, 50(4), 417-426.
65. Girisa, S., Saikia, Q., Bordoloi, D., Banik, K., Monisha, J., Daimary, U. D., ... & Kunnumakkara, A. B. (2021). Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. *IUBMB life*, 73(8), 1016-1044.
66. Godos, J., Currenti, W., Angelino, D., Mena, P., Castellano, S., Caraci, F., ... & Grosso, G. (2020). Diet and mental health: Review of the recent updates on molecular mechanisms. *Antioxidants*, 9(4), 346.
67. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ERO'S: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010
68. Griffith, O. W., & Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (Sn-butyl homocysteine sulfoximine). *Journal of Biological Chemistry*, 254(16), 7558-7560.
69. Guo, Minmin et al. Biochanin A provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, v. 25, p. 8975, 2019).
70. Hambricht, W. S., Fonseca, R. S., Chen, L., Na, R., & Ran, Q. (2017). Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox biology*, 12, 8-17.
71. Hamby, M. E., & Sofroniew, M. V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*, 7(4), 494-506.

72. Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, 119(2), 203-210.
73. Hardingham, N., Dachtler, J., & Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 190.
74. He, J., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2017). Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), 9086-9091
75. Henneman, N. F., Foster, S. L., Chrenek, M. A., Sellers, J. T., Wright, C. B., Schmidt, R. H., ... & Boatright, J. H. (2018). Xanthohumol protects morphology and function in a mouse model of retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(1), 45-53.
76. Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377-1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
77. Hibbs Jr, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z., & Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, 157(1), 87-94.
78. Hisanaga, A., Mukai, R., Sakao, K., Terao, J., & Hou, D. X. (2016). Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of 8-prenyl quercetin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(5), 1020-1032.
79. Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, 32, 121-130.
80. Hostenbach, S., Cambron, M., D'haeseleer, M., Kooijman, R., & De Keyser, J. (2014). Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neuroscience letters*, 565, 39-41.
81. Hsieh, H. L., & Yang, C. M. (2013). Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *BioMed research international*, 2013.
82. Hsu, H. Y., & Wen, M. H. (2002). Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22131-22139.
83. Iitsuka, I., Motoyoshi-Yamashiro, A., Moriyama, M., Kannan-Hayashi, Y., Fujimoto, Y., Takano, K., ... & Nakamura, Y. (2012). Extracellular superoxide dismutase in cultured astrocytes: decrease in cell-surface activity and increase in medium activity by lipopolysaccharide-stimulation. *Neurochemical research*, 37(10), 2108-2116.
84. Ishihara, Y., Takemoto, T., Itoh, K., Ishida, A., & Yamazaki, T. (2015). Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry*, 290(37), 22805-22817.
85. Ishkaeva, R. A., Zoughaib, M., Laikov, A. V., Angelova, P. R., & Abdullin, T. I. (2022). Probing Cell Redox State and Glutathione-Modulating Factors Using a Monochlorobimane-Based Microplate Assay. *Antioxidants*, 11(2), 391.

86. Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A., & Pathak, D. (2022). Glutathione in brain disorders and aging. *Molecules*, 27(1), 324.
87. Jabbari, M., & Jabbari, A. (2016). Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 489, 392-399.
88. Jing, H., Wang, S., Wang, M., Fu, W., Zhang, C., & Xu, D. (2017). Isobavachalcone attenuates MPTP-induced Parkinson's disease in mice by inhibition of microglial activation through NF- κ B pathway. *PLoS One*, 12(1), e0169560.
89. Jo, S. H., Kim, M. E., Cho, J. H., Lee, Y., Lee, J., Park, Y. D., & Lee, J. S. (2019). Hesperetin inhibits neuroinflammation on microglia by suppressing inflammatory cytokines and MAPK pathways. *Archives of pharmacal research*, 42(8), 695-703.
90. Jung, H. A., Jeong, D. M., Chung, H. Y., Lim, H. A., Kim, J. Y., Yoon, N. Y., & Choi, J. S. (2008). Re-evaluation of the antioxidant prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 908-915.
91. Justo, A. F. O., & Suemoto, C. K. (2022). The modulation of neuroinflammation by inducible nitric oxide synthase. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(2), 155-158.
92. Karthika, C., Appu, A. P., Akter, R., Rahman, M., Tagde, P., Ashraf, G. M., ... & Bungau, S. (2022). Potential innovation against Alzheimer's disorder: a tricomponent combination of natural antioxidants (vitamin E, quercetin, and basil oil) and the development of its intranasal delivery. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16.
93. Khorrooshi, R., Babcock, A. A., & Owens, T. (2008). NF- κ B-driven STAT2 and CCL2 expression in astrocytes in response to brain injury. *The Journal of Immunology*, 181(10), 7284-7291.
94. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325.
95. Kouhestani, S., Jafari, A., & Babaei, P. (2018). Kaempferol attenuates cognitive deficit via regulating oxidative stress and neuroinflammation in an ovariectomized rat model of sporadic dementia. *Neural Regeneration Research*, 13(10), 1827.
96. Kramer, B. C., Yabut, J. A., Cheong, J., JnoBaptiste, R., Robakis, T., Olanow, C. W., & Mytilineou, C. (2002). Lipopolysaccharide prevents cell death caused by glutathione depletion: possible mechanisms of protection. *Neuroscience*, 114(2), 361-372.
97. Krishnakumar, N., Sulfikkarali, N., RajendraPrasad, N., & Karthikeyan, S. (2011). Enhanced anticancer activity of naringenin-loaded nanoparticles in human cervical (HeLa) cancer cells. *Biomedicine & preventive nutrition*, 1(4), 223-231.
98. KRISHNAKUMAR, Narendran et al. Enhanced anticancer activity of naringenin-loaded nanoparticles in human cervical (HeLa) cancer cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 1, n. 4, p. 223-231, 2011.
99. KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.

100. LACZA, Zsombor; PANKOTAI, Eszter; BUSIJA, David W. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, v. 14, p. 4436, 2009.
101. LEE, Kyung Hee; CHA, Myeounghoon; LEE, Bae Hwan. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 19, p. 7152, 2020 <https://doi.org/10.3390/ijms21197152>
102. Lee, M. H., Kim, J. Y., & Ryu, J. H. (2005). Prenylflavones from *Psoralea corylifolia* inhibit nitric oxide synthase expression through the inhibition of I- κ B- α degradation in activated microglial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(12), 2253-2257.
103. Lee, P., & Ulatowski, L. M. (2019). Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB life*, 71(4), 424-429.
104. Lee, Y., Lee, S., Chang, S. C., & Lee, J. (2019). Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Archives of pharmacal research*, 42(5), 416-425.
105. Li, P. Y., Liang, Y. C., Sheu, M. J., Huang, S. S., Chao, C. Y., Kuo, Y. H., & Huang, G. J. (2018). Alpinumisoflavone attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the effects of anti-oxidation and anti-inflammation both in vitro and in vivo. *RSC advances*, 8(55), 31515-31528.
106. Liddell, J. R., Robinson, S. R., Dringen, R., & Bishop, G. M. (2010). Astrocytes retain their antioxidant capacity into advanced old age. *Glia*, 58(12), 1500-1509.
107. Lim, R., & Bosch, E. P. (1990). Isolation of astrocytes and Schwann cells for culture. In *Methods in Neurosciences* (Vol. 2, pp. 47-56). Academic Press.
108. Lindenau, J., Noack, H., Possel, H., Asayama, K., & Wolf, G. (2000). Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia*, 29(1), 25-34.
109. Lindhout, I. A., Murray, T. E., Richards, C. M., & Klegeris, A. (2021). Potential neurotoxic activity of diverse molecules released by microglia. *Neurochemistry International*, 148, 105117.
110. Liy, P. M., Puzi, N. N. A., Jose, S., & Vidyadaran, S. (2021). Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(22), 2399-2406.
111. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118. doi: 10.4103/0973-7847.70902
112. Losada-Barreiro, S., & Bravo-Diaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 133, 379-402.
113. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
114. Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012.

115. Lushchak, V. I., Duszenko, M., Gospodaryov, D. V., & Garaschuk, O. (2021). Oxidative stress and energy metabolism in the brain: Midlife as a turning point. *Antioxidants*, 10(11), 1715.
116. Maher, P. (2009). Modulation of multiple pathways involved in the maintenance of neuronal function during aging by fisetin. *Genes & nutrition*, 4(4), 297-307.
117. Maier, C. M., & Chan, P. H. (2002). Book review: role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist*, 8(4), 323-334.
118. Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, 299, 125124.
119. Massaad, C. A., & Klann, E. (2011). Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 2013-2054. 10.1089 / ars.2010.3208
120. McBean, G. J. (2018). Astrocyte antioxidant systems. *Antioxidants*, 7(9), 112.
121. McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
122. Mead, C., & Pentreath, V. W. (1998). Evaluation of toxicity indicators in rat primary astrocytes, C6 glioma and human 1321N1 astrocytoma cells: can gliotoxicity be distinguished from cytotoxicity?. *Archives of toxicology*, 72(6), 372-380.
123. Mehta, V., Parashar, A., & Udayabanu, M. (2017). Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. *Physiology & behavior*, 171, 69-78.
124. Meščić Macan, A., Gazivoda Kraljević, T., & Raić-Malić, S. (2019). Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. *Antioxidants*, 8(8), 247.
125. Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2006). Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1676-1689.
126. Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., & Santillo, M. (2016). The Cu, Zn superoxide dismutase: not only a dismutase enzyme. *Frontiers in physiology*, 7, 594.
127. Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell research*, 21(1), 103-115. doi: 10.1038/cr.2010.178
128. Moulson, A. J., Squair, J. W., Franklin, R. J., Tetzlaff, W., & Assinck, P. (2021). Diversity of Reactive Astrogliosis in CNS Pathology: Heterogeneity or Plasticity?. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 284.
129. Mukai, R. (2018). Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(2), 207-215.
130. Mulder, K. M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGF β signaling. *Cytokine & growth factor reviews*, 11(1-2), 23-35.
131. Murphy, S. (2000). Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia*, 29(1), 1-13.

132. Mytilineou, C., Kramer, B. C., & Yabut, J. A. (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism & related disorders*, 8(6), 385-387.
133. Nago, R. D. T., Nayim, P., Mbaveng, A. T., Mpetga, J. D. S., Bitchagno, G. T. M., Garandi, B., ... & Ngouela, A. S. (2021). Prenylated flavonoids and C-15 isoprenoid analogues with antibacterial properties from the whole plant of *Imperata cylindrica* (L.) Raeusch (Gramineae). *Molecules*, 26(16), 4717.
134. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
135. Nascimento, R. P., Dos Santos, B. L., da Silva, K. C., Amaral da Silva, V. D., de Fátima Costa, M., David, J. M., ... & Costa, S. L. (2021). Reverted effect of mesenchymal stem cells in glioblastoma treated with agathisflavone and its selective antitumoral effect on cell viability, migration, and differentiation via STAT3. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 5022-5035.
136. Neal, M., Luo, J., Harischandra, D. S., Gordon, R., Sarkar, S., Jin, H., ... & Kanthasamy, A. (2018). Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes. *Glia*, 66(10), 2137-2157.
137. Nelson, E. J., Connolly, J., & McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biology of the Cell*, 95(1), 3-8.
138. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.
139. Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Astrocytes*, 23-45.
140. Oliveira-Junior, M. S., Pereira, E. P., de Amorim, V. C. M., Reis, L. T. C., do Nascimento, R. P., da Silva, V. D. A., & Costa, S. L. (2019). Lupeol inhibits LPS-induced neuroinflammation in cerebellar cultures and induces neuroprotection associated to the modulation of astrocyte response and expression of neurotrophic and inflammatory factors. *International immunopharmacology*, 70, 302-312.
141. Owens, T., Bechmann, I., & Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(12), 1113-1121.
142. Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(5), 1161-1168.
143. Park, H. A., & Ellis, A. C. (2020). Dietary antioxidants and Parkinson's disease. *Antioxidants*, 9(7), 570.
144. Park, H. J., Ra, J. H., Han, M. Y., & Chung, J. H. (2007). Hesperidin induces apoptosis in SNU-668, human gastric cancer cells. *Molecular & Cellular Toxicology*, 3(1), 31-35.
145. Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., & Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature*, 369(6483), 744-747.
146. PATEL, Kanika; PATEL, Dinesh Kumar. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise

- report. *Journal of traditional and complementary medicine*, v. 7, n. 3, p. 360-366, 2017.
147. PATEL, Kanika; SINGH, Gireesh Kumar; PATEL, Dinesh Kumar. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. *Chinese journal of integrative medicine*, v. 24, n. 7, p. 551-560, 2018.
 148. Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition research*, 18(12), 1995-2018.
 149. PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
 150. Pollard, S. E., Kuhnle, G. G., Vauzour, D., Vafeiadou, K., Tzounis, X., Whiteman, M., ... & Spencer, J. P. (2006). The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(4), 960-968.
 151. Poon, H. F., Calabrese, V., Scapagnini, G., & Butterfield, D. A. (2004). Free radicals and brain aging. *Clinics in geriatric medicine*, 20(2), 329-359.
 152. Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PloS one*, 8(5), e64372.
 153. Rae, C. D., & Williams, S. R. (2017). Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Analytical biochemistry*, 529, 127-143.
 154. Rahman, M. Z., Rahman, M. S., Kaisar, A., Hossain, A., & Rashid, M. A. (2010). Bioactive isoflavones from *Erythrina variegata* L. *Turk J Pharm Sci*, 7(1), 21-28.
 155. Ransom, B. R., & Ransom, C. B. (2012). Astrocytes: multitasking stars of the central nervous system. *Astrocytes*, 3-7.
 156. Rashno, M., Sarkaki, A., Farbood, Y., Rashno, M., Khorsandi, L., Naseri, M. K. G., & Dianat, M. (2019). Therapeutic effects of chrysin in a rat model of traumatic brain injury: A behavioral, biochemical, and histological study. *Life sciences*, 228, 285-294.
 157. Reis, P. A., de Albuquerque, C. F. G., Gutierrez, T. M., Silva, A. R., & de Castro Faria Neto, H. C. (2017). Role of nitric oxide synthase in the function of the central nervous system under normal and infectious conditions. *Nitric Oxide Synthase—Simple Enzyme-Complex Roles*. London: InTech, 55-70.
 158. Ribeiro, S. M. R., de Queiroz, J. H., Peluzio, M. D. C. G., Costa, N. M. B., da Matta, S. L. P., & de Queiroz, M. E. L. R. (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*, 21(3).
 159. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
 160. RICE-EVANS, Catherine A. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.
 161. Rodgers, KR, Lin, Y., Langan, TJ, Iwakura, Y., & Chou, RC (2020). As funções imunes inatas dos astrócitos são dependentes do fator de necrose tumoral-alfa. *Relatórios científicos* , 10 (1), 1-15.

162. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., ... & Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62.
163. Rosenfeld, G. (1947). Pancromic staining for clinical hematology and cytology: a novel combination of May-Grunwald and Giemsa components in one rapid usage staining. *Mem. Inst. Butantan*, 20, 329-335.
164. Saha, R. N., & Pahan, K. (2006). Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochemistry international*, 49(2), 154-163.
165. Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238, 123046.
166. Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201-205.
167. Santos, C. M., & Silva, A. (2020). The antioxidant activity of prenylflavonoids. *Molecules*, 25(3), 696.
168. Seo, K. H., Lee, D. Y., Jeong, R. H., Lee, D. S., Kim, Y. E., Hong, E. K., ... & Baek, N. I. (2015). Neuroprotective effect of prenylated arylbenzofuran and flavonoids from *Morus alba* fruits on glutamate-induced oxidative injury in HT22 hippocampal cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(4), 403-408.
169. Sheng, W. S., Hu, S., Feng, A., & Rock, R. B. (2013). Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochemical research*, 38(10), 2148-2159.
170. Sheng, W., Zong, Y., Mohammad, A., Ajit, D., Cui, J., Han, D., ... & Sun, G. Y. (2011). Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA2-IIA expression in astrocytes and microglia. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), 1-15.
171. Shivangi Sharma, Abdul Hafeez, Shazia Afzal Usmani (2022). Nanoformulation approaches of naringenin- an updated review on leveraging pharmaceutical and preclinical attributes from the bioactive, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76(5), 103724.
172. Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Souza, C. D. S., Freitas, S. B., Vasconcellos, V., Freire, S. M., ... & Costa, S. L. (2008). The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, 24(1), 75-86.
173. Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129(4), 877-896.
174. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583.
175. Singh, S. S., Rai, S. N., Birla, H., Zahra, W., Rathore, A. S., & Singh, S. P. (2020). NF- κ B-mediated neuroinflammation in Parkinson's disease and potential therapeutic effect of polyphenols. *Neurotoxicity Research*, 37(3), 491-507.

176. Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). "Sweet flavonoids": Glycosidase-catalyzed modifications. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2126.
177. Smeyne, M., & Smeyne, R. J. (2013). Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free radical biology and medicine*, 62, 13-25.
178. Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12), 638-647.
179. Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. *Trends in Immunology*, 41(9), 758-770.
180. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
181. Stompor, M., Uram, Ł., & Podgórski, R. (2017). In vitro effect of 8-prenylnaringenin and naringenin on fibroblasts and glioblastoma cells-cellular accumulation and cytotoxicity. *Molecules*, 22(7), 1092.
182. Tajes, M., Ill-Raga, G., Palomer, E., Ramos-Fernández, E., Guix, F. X., Bosch-Morató, M., ... & Muñoz, F. J. (2013). Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
183. Tao, Z., Liu, J., Jiang, Y., Gong, L., & Yang, B. (2017). Synthesis of prenylated flavonols and their potents as estrogen receptor modulator. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
184. Tatoyan, A., & Giulivi, C. (1998). Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11044-11048.
185. Taylor, J. M., Main, B. S., & Crack, P. J. (2013). Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochemistry international*, 62(5), 803-819.
186. Teixeira M. I., Lopes C. M., Amaral M. H., Costa P. C. (2023). Surface-modified lipid nanocarriers for crossing the blood-brain barrier (BBB): A current overview of active targeting in brain diseases, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 221(09),112999.
187. Terao, J., & Mukai, R. (2014). Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 559, 12-16.
188. Tewari, D., Sah, A. N., Bawari, S., Nabavi, S. F., Dehpour, A. R., Shirooie, S., ... & Nabavi, S. M. (2021). Role of nitric oxide in neurodegeneration: function, regulation, and inhibition. *Current neuropharmacology*, 19(2), 114-126.
189. Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.
190. Trist, B. G., Hilton, J. B., Hare, D. J., Crouch, P. J., & Double, K. L. (2021). Superoxide dismutase 1 in health and disease: how a frontline antioxidant becomes neurotoxic. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(17), 9215-9246.
191. Ul Hassan, S. S., Samanta, S., Dash, R., Karpiński, T. M., Habibi, E., Sadiq, A., ... & Bunagu, S. (2022). The neuroprotective effects of fisetin,

- a natural flavonoid in neurodegenerative diseases: Focus on the role of oxidative stress. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
192. US Department of Agriculture, Citrus: World Markets and Trade, Report July 2019.
 193. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
 194. Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H. Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R. J., & Spencer, J. P. (2009). The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 484(1), 100-109.
 195. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
 196. Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5).
 197. Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological reviews*, 98(1), 239-389.
 198. Verkhatsky, A., Marutle, A., Rodriguez-Arellano, J. J., & Nordberg, A. (2015). Glial asthenia and functional paralysis: a new perspective on neurodegeneration and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist*, 21(5), 552-568.
 199. Victor, M. M., Leite, J. L., Ramos, G. S., David, J. M., & Cardoso, K. V. (2021). UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA EM AULAS DE GRADUAÇÃO DE QUÍMICA ORGÂNICA EXPERIMENTAL: EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES A PARTIR DE RESÍDUOS DE CASCAS DE FRUTAS CÍTRICAS. *Química Nova*, 43, 1522-1528.
 200. Voskuhl, R. R., Peterson, R. S., Song, B., Ao, Y., Morales, L. B. J., Tiwari-Woodruff, S., & Sofroniew, M. V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *Journal of Neuroscience*, 29(37), 11511-11522.
 201. Wang, J., & Mazza, G. (2002). QUANTIFICATION OF NITRITE IN THE PRESENCE OF ANTHOCYANINS USING GRIESS AND GC/MS ASSAYS 1. *Journal of food biochemistry*, 26(4), 339-354.
 202. Wang, J., Wang, H., Sun, K., Wang, X., Pan, H., Zhu, J., ... & Li, X. (2018). Chrysin suppresses proliferation, migration, and invasion in glioblastoma cell lines via mediating the ERK/Nrf2 signaling pathway. *Drug design, development and therapy*, 12, 721.
 203. Wang, T., Qin, L., Liu, B., Liu, Y., Wilson, B., Eling, T. E., ... & Hong, J. S. (2004). Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *Journal of neurochemistry*, 88(4), 939-947.
 204. WEN, Jiping et al. Preparation and physicochemical properties of the complex of naringenin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Molecules*, v. 15, n. 6, p. 4401-4407, 2010.

205. Wen, L., Shi, D., Zhou, T., Tu, J., He, M., Jiang, Y., & Yang, B. (2020). Identification of two novel prenylated flavonoids in mulberry leaf and their bioactivities. *Food chemistry*, 315, 126236.
206. Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51-66.
207. Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., ... & Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17513-17518.
208. Wilmsen, P. K., Spada, D. S., & Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(12), 4757-4761.
209. Wilson, J. X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(10-11), 1149-1163.
210. Wong, P. C., Waggoner, D., Subramaniam, J. R., Tessarollo, L., Bartnikas, T. B., Culotta, V. C., ... & Gitlin, J. D. (2000). Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2886-2891.
211. Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(9), 1874-1905.
212. Xu, M. J., Wu, B., Ding, T., Chu, J. H., Li, C. Y., Zhang, J., ... & Li, P. (2012). Simultaneous characterization of prenylated flavonoids and isoflavonoids in *Psoralea corylifolia* L. by liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(19), 2343-2358.
213. Yang, X., Jiang, Y., Yang, J., He, J., Sun, J., Chen, F., ... & Yang, B. (2015). Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. *Trends in Food Science & Technology*, 44(1), 93-104.
214. Yu, H., Shi, J., Lin, Y., Zhang, Y., Luo, Q., Huang, S., ... & Ji, L. (2022). Icaritin Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology by Alleviating Myelin Injury in 3x Tg-AD Mice. *Neurochemical Research*, 47(4), 1049-1059.
215. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ERO'S and ERO'S-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

10.ANEXOS

10.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

1. do Nascimento, R. P., Dos Santos, B. L., Amparo, J. A. O., **Soares, J. R. P.**, da Silva, K. C., Santana, M. R., ... & Costa, S. L. (2022). Neuroimmunomodulatory Properties of Flavonoids and Derivates: A Potential Action as Adjuvants for the Treatment of Glioblastoma. *Pharmaceutics*, 14(1), 116. DOI 10.3390/pharmaceutics14010116
2. Costa Reis, L. T., Sena de Souza, J., Hirochi Herai, R., Cunha, E. B., **Ribeiro Pereira Soares, J.**, Santos El-Bachá, R., ... & Telles da Cunha Lima, S. (2021). Intergenerational thyroid hormone homeostasis imbalance in cerebellum of rats perinatally exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology*, 36(6), 1031-1042. DOI 10.1002/tox.23102

10.2 PREMIAÇÕES DURANTE O MESTRADO

2022 Melhor pôster, categoria mestrado, intitulado "Evaluation of antioxidant and anti-neuroinflammatory activity of flavonoids and synthetic derivatives against inflammatory damage in glial cells", XXII ExpoPPGI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Imunologia.

10.3 PARECER CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Prospecção de potencial farmacológico de metabolitos de plantas em modelos de doenças do SNC.", protocolada sob o CEUA nº 6731220818 (ID 000058), sob a responsabilidade de **Silvia Lima Costa** e equipe; *Silvia Lima Costa; Maria de Fátima Dias Costa; Ramon dos Santos El-Bachá; Victor Diógenes Amaral da Silva; Suzana Braga de Souza; Juliana Helena Castro e Silva; Leticia Oliveira dos Santos; Monique Marilyn Alves de Almeida Carneiro; Naiara Silva Dourado; Balbino Lino dos Santos; Joana Luz Oliveira; Ravena Pereira Nascimento; Cleonice Creusa dos Santos; Fillipe Mendes de Araújo; Rafael Short Ferreira; Luã Tainã Costa Reis; Jessika Alves Oliveira Amparo; Fernanda Bueno de Oliveira; Sarah Alexandra Silva Lima; Janaina Ribeiro Pereira Soares* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 20/03/2019.

We certify that the proposal "Prospecting the pharmacological potential of plant metabolites in CNS disease models.", utilizing 107 Heterogenics rats (males and females), 77 Isogenics mice (77 males), protocol number CEUA 6731220818 (ID 000058), under the responsibility of **Silvia Lima Costa** and team; *Silvia Lima Costa; Maria de Fátima Dias Costa; Ramon dos Santos El-Bachá; Victor Diógenes Amaral da Silva; Suzana Braga de Souza; Juliana Helena Castro e Silva; Leticia Oliveira dos Santos; Monique Marilyn Alves de Almeida Carneiro; Naiara Silva Dourado; Balbino Lino dos Santos; Joana Luz Oliveira; Ravena Pereira Nascimento; Cleonice Creusa dos Santos; Fillipe Mendes de Araújo; Rafael Short Ferreira; Luã Tainã Costa Reis; Jessika Alves Oliveira Amparo; Fernanda Bueno de Oliveira; Sarah Alexandra Silva Lima; Janaina Ribeiro Pereira Soares* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 03/20/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **12/2022** Área: **Biociências**

| | | | | | | | |
|-----------|--|-------|-----------------|--------|----------------|----|----|
| Origem: | Biotério do Laboratório de Neurociências | | | | | | |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | sexo: | Machos e Fêmeas | idade: | 0 a 2 dias | N: | 81 |
| Linhagem: | Wistar | | | Peso: | 3 a 6 g | | |
| Origem: | Biotério do Instituto Gonçalo Muniz | | | | | | |
| Espécie: | Camundongos isogênicos | sexo: | Machos | idade: | 4 a 8 semanas | N: | 77 |
| Linhagem: | CS7BL/6 | | | Peso: | 40 a 55 g | | |
| Origem: | Biotério do Laboratório de Neurociências | | | | | | |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | sexo: | Machos e Fêmeas | idade: | 6 a 8 dias | N: | 12 |
| Linhagem: | Wistar | | | Peso: | 15 a 20 g | | |
| Origem: | Biotério do Laboratório de Neurociências | | | | | | |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | sexo: | Fêmeas | idade: | 6 a 14 semanas | N: | 14 |
| Linhagem: | Wistar | | | Peso: | 200 a 300 g | | |

Local do experimento: Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/nº, Vale do Canela, Salvador, 40.110-902, Salvador, Bahia.

Salvador, 25 de março de 2019



Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)