

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA

**EFEITO NEUROPROTETOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE
CÉLULAS *NEURON-LIKE* DESAFIADAS POR EXCITOTOXICIDADE
MEDIADA POR GLUTAMATO**

Aluno: Ms. Bruno Iglesias Benincasa

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni

RIBEIRÃO PRETO

ESTADO DE SÃO PAULO

2019

Bruno Iglesias Benincasa

EFEITO NEUROPROTETOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE
CÉLULAS *NEURON-LIKE* DESAFIADAS POR EXCITOTOXICIDADE MEDIADA
POR GLUTAMATO

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da
Universidade de Ribeirão Preto, como requisito para a
obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni

Ribeirão Preto

2019

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Benincasa, Bruno Iglesias, 1983-

B467e Efeito neuroprotetor de compostos fenólicos sobre células
Neuron-like desafiadas por excitotoxicidade mediada por glutamato /

Bruno Iglesias Benincasa. – Ribeirão Preto, 2019.

55 f.: il. color.

Orientador: Prof. Me. Renê de Oliveira Beleboni.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2019.

BRUNO IGLESIAS BENINCASA

**EFEITO NEUROPROTETOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE
CÉLULAS *NEURON-LIKE* DESAFIADAS POR EXCITOTOXICIDADE
MEDIADA POR GLUTAMATO.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Ribeirão
Preto, para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 30 de outubro de 2019

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni
Presidente/UNAERP

Prof. Dr. José Luiz Liberato
(FMRP-USP)

Prof. Dr. Rodrigo César Rorato
UNAERP

Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
UNAERP

Profa. Dra. Renata Dellalibera Joviliano
UNAERP

RIBEIRÃO PRETO

2019

Agradecimentos

Gostaria de agradecer,

primeiramente a Deus por esta oportunidade, à minha avó que com seu amor e ternura me incentivou, aos meus pais pelo carinho e compreensão, ao meu querido irmão pelo apoio, aos meus queridos tios pelo suporte, à minha esposa pelo amor, compreensão e paciência durante os percalços, aos meus filhos por toda alegria e energia que me dão e ao meu grande orientador pela oportunidade e por ter acreditado na minha capacidade.

Sumário

Resumo.....	6
Palavras-chaves.....	6
Abstract.....	7
1. 78	
2. 1921	
3. Materiais e métodos.....	22
3.1 Materiais.....	22
3.2 Cultivo celular.....	22
3.2.1 Manutenção da linhagem de células PC-12.....	22
3.2.1.1 Subcultivo da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes.....	23
3.3 Ensaio biológicos.....	23
3.3.1 . Indução de crescimento de neuritos e diferenciação de PC12.....	23
3.3.2 Viabilidade celular.....	23
3.3.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	24
3.4 Teste para avaliação da Lactato desidrogenase (LDH).....	24
3.5 Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (DHE).....	25
3.6. Análise de morte celular.....	25
3.6.1 Citometria de fluxo.....	25
3.7. Dosagem de interleucinas.....	26
3.8 Análise estatística	26
4. Resultados e Discussão	27
4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	27
4.2 Teste para avaliação da Lactato desidrogenase (LDH).....	35
4.3 Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (DHE).....	36
4.4 Citometria de fluxo.....	38
4.5 Mensuração de interleucinas.....	39
5.0 CONCLUSÃO	42
6.0 Referências Bibliográficas	43

Lista de figuras

Figura 1A. Exemplo de estruturas químicas de tipos de flavonoides.....	17
Figura 1B. Estrutura química dos flavonoides utilizados no presente trabalho.....	19
Figura 2. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com luteolina.....	29
Figura 3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com fisetina.....	30
Figura 4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com icarina.....	30
Figura 5. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com ácido elágico.....	31
Figura 6. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com mircetina.....	31
Figura 7. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com genisteína.....	32
Figura 8. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com galangina.....	32
Figura 9. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com hesperidina.....	33
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com silibina.....	33
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato após 24h da incubação com diosmina.....	34
Figura 12. Ensaio da lactato desidrogenase.....	36
Figura 13. Avaliação das espécies reativas de oxigênio.....	37
Figura 14. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio.....	39
Figura 15. Dosagem da interleucina TNF- α	41

Lista de abreviaturas

MTT = 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazólio

PC12 = Linhagem celular derivada de um feocromocitoma da medula suprarrenal de rato

DHE = Di-hidroetídio

SNC = Sistema Nervoso Central

IDH = Índices de desenvolvimento humano

DA = Doença de Alzheimer

DP = Doença de Parkinson

DH = Doença de Huntington

ELA = Esclerose lateral amiotrófica

ERO = Espécies reativas de oxigênio

O⁻² = Superóxido

NO[•] = Monóxido nítrico

Ca⁺² = Íons cálcio

mTOR = Alvo de mamíferos da rapamicina

Nec-1 = Necrostatina 1

Bcl2 = Beta ciclina 2

APAF1 = Proteína fator de ativação da protease apoptótica 1

CARD = Domínio de recrutamento

TNF = Fator de necrose tumoral

TRAIL = ligante TNF relacionado à indução de apoptose

MHC-II = Complexo de histocompatibilidade

IL = Interleucinas

SOD1 = Superóxido dismutase 1

GABA = Ácido gama-aminobutírico

NGF = Nerve growth factor

DMSO = dimetilsulfóxido

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

PBS = Tampão fosfato-salino

DE₅₀ = Dose efetiva

TNF α = Fator de necrose tumoral α

MOMP = Permeabilização da membrana mitocondrial exterior

RESUMO

As doenças neurodegenerativas impactam aproximadamente um terço da população mundial. Dentre as características mais marcantes nas doenças neurodegenerativas destacam-se a excitotoxicidade mediada pelo glutamato e a decorrente quantidade aumentada de espécies reativas de oxigênio, disparo de eventos inflamatórios e a morte de células nervosas. Diferentes classes de flavonoides são conhecidas por suas potenciais atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Com efeito, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito protetor de diferentes flavonoides (genisteína, galangina, luteolina, ácido elágico, fisetina, icarina, diosmina, silibina, miricetina e hesperidina) sobre células neuron-like desafiadas por excitotoxicidade mediada por glutamato através da combinação de diferentes ensaios bioquímicos e de biologia celular. Os resultados permitem concluir que a maioria dos diferentes flavonoides aqui avaliados protegem, em diferentes níveis e magnitudes, as células PC12 diferenciadas dos danos causados pela excitotoxicidade mediada por glutamato. De fato, diferentes flavonoides foram capazes de sustentar a viabilidade celular ainda que as células fossem expostas aos efeitos lesivos do glutamato no teste do MTT. Os diferentes flavonoides ativos exercem seus efeitos citoprotetores principalmente através de suas propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias, reveladas através do teste do DHE e dosagem do TNF- α , o que vincula a proteção celular oferecida pela maioria dos diferentes flavonoides frente a apoptose, como mostrado pela citometria de fluxo e indiretamente pelo teste do MTT. Isto corrobora a relevância experimental do presente trabalho e ratifica a importância dos flavonoides como classe fitoquímica de interesse biotecnológico e farmacêutico, importante no melhor entendimento e potencial tratamento de diferentes doenças neurodegenerativas, onde a excitotoxicidade mediada por glutamato possa estar presente.

PALAVRAS-CHAVES

Flavonoides, neuron-like, neurotoxicidade, glutamato, PC12 diferenciada

Abstract

Neurodegenerative diseases impact approximately one third of the world's population. Among the most striking features in neurodegenerative diseases are glutamate-mediated excitotoxicity and the resulting increased amount of reactive oxygen species, triggering of inflammatory events, and nerve cell death. Different classes of flavonoids are known for their potential antioxidant and anti-inflammatory activities. Indeed, the objective of this study was to evaluate the potential protective effect of different flavonoids (genistein, galangin, luteoline, ellagic acid, fisetin, icarina, diosmine, silybin, mirycetin and hesperidin) on glutamate-mediated excitotoxicity challenged by of the combination of different biochemical and cell biology assays. The results allow us to conclude that most of the different flavonoids evaluated here protect, at different levels and magnitudes, differentiated PC12 cells from damage caused by glutamate mediated excitotoxicity. In fact, different flavonoids were able to sustain cell viability even though cells were exposed to the harmful effects of glutamate in the MTT test. The different active flavonoids exert their cytoprotective effects mainly through their anti-oxidation and / or anti-inflammatory properties, revealed by DHE testing and TNF- α dosage, which links the cellular protection offered by most different flavonoids against apoptosis as shown by flow cytometry and indirectly by the MTT test. This corroborates the experimental relevance of the present work and ratifies the importance of flavonoids as a phytochemical class of biotechnological and pharmaceutical interest, important in better understanding and potential treatment of different neurodegenerative diseases, where glutamate mediated excitotoxicity may be present.

KEYWORDS

Flavonoids, neuron-like, neurotoxicity, glutamate, differentiated PC12

1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento, em termos de importância, das doenças neurodegenerativas ocorreu através da mudança na maneira de mensurar o impacto de cada doença. Com efeito, a mensuração de doença deixou de ser baseada apenas na quantidade de mortes para que fosse medida também em anos de vida perdidos acrescidos daqueles de vida vividos impactados por uma dada deficiência, na sigla em inglês (DALY'S). Com o advento do DALY, foi observado que aproximadamente 28% da população global é acometida por doenças degenerativas (SILBERBERG et al., 2015).

Estima-se que existam aproximadamente 600 doenças que afetem o Sistema Nervoso Central (SNC). Dentre as enfermidades de maior impacto geral, destacam-se as doenças neurodegenerativas (EUROPEAN COMISSION, 2017). Muitas destas doenças levam o sistema nervoso à progressiva perda das suas funções devido à degeneração e morte de células nervosas, imputando aos acometidos prejuízos motores, de aprendizagem/memória, emocionais, e comportamentais diversos, além é claro, da demência (OMS, 2017).

Com a melhora nos índices de desenvolvimento humano (IDH) na maioria das diferentes regiões mundiais, tem-se percebido uma transição interpretativa das causas dos problemas de saúde pública. Algumas das causas mais focadas nas más condições de vida e mazelas sociais estão atualmente agregando também os aspectos relacionados ao envelhecimento populacional. O aumento da expectativa de vida também tem aumentado em países em desenvolvimento ou mesmo subdesenvolvidos, o que precipita o aparecimento e/ou melhor notificação das desordens neurodegenerativas, comuns em idosos (PRINCE et al., 2015).

Segundo estudo de Gustavsson et al. (2011), o impacto econômico decorrente de desordens neurológicas cerebrais na União Europeia, no ano de 2010, girou em torno de €798 bilhões. A este custo somam-se os gastos diretos e indiretos com o tratamento e perda de produção econômica dos pacientes. Estima-se que as doenças neurodegenerativas superem o câncer como a segunda principal causa de morte no mundo por volta do ano 2040. Para

demonstrar a importância em termos econômicos, atualmente, os gastos para tratar este tipo de doença encontram-se em torno de U\$\$ 20 bilhões/ano e com perspectivas de crescimento acelerado doravante.

Nesse novo cenário que se desenvolve em cima de uma das maiores conquistas do ser humano, o aumento da expectativa de vida, é conveniente que grupos de pesquisa, em geral multidisciplinares, compreendam e desenvolvam com antecedência potenciais biomarcadores e terapias para doenças neurodegenerativas (GAMMON, 2014).

Dentre as principais doenças neurodegenerativas destacam-se a Doença de Alzheimer (DA), a Doença de Parkinson (DP), a Doença de Huntington (DH) (KATSNELSON; STROOPER; ZOGHBI, 2016) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (LILL et al., 2015). Em comum, tais doenças apresentam como característica a morte neuronal e/ou acúmulo/agregação de proteínas anormais no interior das células nervosas. Todavia, essa agregação proteica não pode ser diminuída/diluída naturalmente pelo processo de divisão celular por praticamente inexistir esse fenômeno em células do sistema nervoso (SON et al., 2012).

Para exemplificar a agregação proteica, segundo Son et al. (2012), na DA, este fato pode ser observado através de placas constituídas pelo acúmulo de peptídeos β -amiloides (HOLTZMAN; MORRIS; GOATE, 2011). Estes peptídeos são formados como resultado da clivagem sequencial da proteína precursora amiloide via β -secretase e γ -secretase e secreção intracelular de emaranhados neurofibrilares contendo Tau hiperfosforilada (SELKOE; HARDY., 2017). Em estudos *in vivo* e *in vitro*, as proteínas β -amiloide e Tau, apesar de envolvidas na toxicidade causada às células nervosas, desempenham papéis aparentemente distintos na progressão da doença. A primeira parece promover a patologia causada pela Tau e esta última, aparentemente, modula a toxicidade da proteína β -amiloide (BRETTSCHEIDER et al., 2015).

De modo semelhante à DA, na DP há também a presença de agregados proteicos, neste caso, os denominados corpos de Lewy. Estes corpúsculos são inclusões intracitoplasmáticas contendo α -sinucleína e ubiquitina em neurônios dopaminérgicos na substância nigra (POEWE et al., 2017). Acredita-se que a patologia se estabeleça quando a α -sinucleína deixa de ser degradada por

macroautofagia, autofagia e quando uma chaperona mediadora do processo encontra-se inibida (SURMEIER; OBESO; HALLIDAY; 2017). Isto resulta na presença de um fenótipo α -sinucleína selvagem de alto peso molecular e insolúvel, indicando que, provavelmente, a mediação por chaperona desempenha papel importante neste processo (SON et al., 2012).

Outra doença neurodegenerativa, contudo de caráter primariamente genético é a DH. Trata-se de uma ataxia espinocerebelar de caráter dominante, relacionada ao acréscimo de 10 a 20% de repetição do conteúdo de CAG no gene da proteína huntingtina (RUZO et al., 2018). Com efeito, diversos estudos apontam para uma relação positiva e direta entre maior severidade e início mais precoce da enfermidade com o maior número das repetições do trinucleotídeo CAG (MARTIN et al., 2015). A maior repetição deste trinucleotídeo que codifica poliglutaminas, se expressa em excesso em produtos gênicos, acarretará na expressão de uma proteína mutante, a huntingtina, que será acumulada e levará à toxicidade e degeneração de neurônios, de modo semelhante às outras doenças aqui descritas (STERNECKERT; REINHARDT; SCHÖLER, 2014).

É imperativo atentar que as doenças neurodegenerativas não partilham somente dos grandes números de acometidos/incidência e participação dos agregados proteicos. Além disso, compartilham da carência e baixa eficácia terapêutica e dos inúmeros efeitos colaterais para o tratamento corrente. De fato e até a presente data, todos os fármacos aprovados somente aliviam os sintomas de tais desordens neurodegenerativas, além de se mostrarem ineficazes em interromper a progressão da doença (PRZEDBORSKI; VILA; JACKSON-LEWIS, 2003).

A maior parte do insucesso no tratamento atual se deve à falta de conhecimento pleno acerca dos mecanismos envolvidos na patologia subjacente às doenças neurodegenerativas. Isto se dá por diferentes motivos, como: alta heterogeneidade e complexidade das doenças neurodegenerativas, dinamicidade das proteínas envolvidas, qual (ais) tipo(s) de molécula(s) desencadeia(m) inicialmente a doença, dificuldade em recrutar grandes grupos de pacientes para identificação de biomarcadores de progressão/prognóstico, ou ainda, para a realização de ensaios clínicos de novos fármacos, sobretudo, no caso de doenças

neurodegenerativas de caráter genético (SWEENEY et al., 2017). De fato, devido ao caráter multifatorial das doenças neurodegenerativas, é possível que haja o envolvimento de vários eventos biológicos atrelados não somente ao início, como também, à manutenção e progressão dessas doenças (BRETTSCHEIDER et al., 2015).

Dentre os eventos biológicos é importante o papel dos radicais livres ou também conhecidos por espécies reativas de oxigênio, na sigla em inglês (ROS). Tais espécies são inerentes ao metabolismo do organismo podendo ser produzidas na fertilização, cadeia respiratória mitocondrial, fagocitose, metabolismo do ácido araquidônico e ovulação, dentre outros processos (SINGH; SHARAD; KAPUR, 2004). As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na transdução de sinais, transcrição gênica, regulação da atividade da guanilato ciclase solúvel, tônus vascular, equilíbrio hemodinâmico, agregação plaquetária, entre outros eventos fisiológicos (BLASER., 2016).

Dentre os radicais livres mais comuns destacam-se o superóxido (O_2^-) e o monóxido nítrico (NO^-) (UTTARA et al., 2009). O cérebro humano, devido ao elevado consumo de O_2 e alta demanda por ATP, torna-se mais susceptível à interferência e geração de radicais livres decorrentes da cadeia respiratória mitocondrial (HALLIWELL, 2001). O cérebro humano é muito sensível aos danos oxidativos e, sua composição rica em lipídeos insaturados, é um dos principais substratos que favorecem reações em cascata de oxidação e peroxidação (STEFANATOS; SANZ., 2018).

Apesar disso, o cérebro possui mecanismos de defesa antioxidante, como por exemplo, a superóxido dismutase e glutatona reduzida, que requerem ferro, selênio, cobre, manganês e zinco como cofatores para catalisar reações químicas que degradam os radicais livres danosos ao SNC (SINGH; SHARAD; KAPUR, 2004). Todavia, apesar da presença de mecanismos de defesa, o cérebro é acometido por danos oxidativos, principalmente, devido à pequena proporção de substâncias antioxidantes presentes neste órgão quando comparado por exemplo ao fígado, cujas reservas antioxidantes são cerca de 10 vezes maiores em concentração (UTTARA et al., 2009).

As causas de danos às estruturas cerebrais não se limitam somente a radicais livres por si só. Além disso, nem sempre são estes elementos que desencadeiam isoladamente os prejuízos verificados nas doenças neurodegenerativas. Em várias doenças neurodegenerativas, por exemplo, os neurotransmissores excitatórios podem possibilitar a entrada de um grande influxo de Ca^{+2} para os neurônios, ocorrendo dessa forma excesso de excitação neuronal e mal funcionamento ou inativação de enzimas, as quais acabarão por promover a formação de produtos oxidantes e as patologias/desajustes deles decorrentes (HALLIWELL, 2001).

Ressalva seja feita quanto à incompleta elucidação das patologias neurodegenerativas, os radicais livres são apontados como, provavelmente, um dos principais fatores para o início destas doenças. De fato, as reações decorrentes da interação dos radicais com inúmeras biomoléculas e formação de produtos finais tóxicos (álcoois, cetonas, aldeídos e outros) são prejudiciais para algumas células de defesa, comprometem as vias de sinalização de cálcio e, geralmente, este desequilíbrio acaba por potencializar as chances de morte de células nervosas (UTTARA et al., 2009).

Apesar de características das doenças neurodegenerativas, a alteração de padrões morfológicos e a morte neuronal não acometem a totalidade das células nervosas e também nem sempre se limitam a uma determinada área cerebral. Ao contrário, as lesões decorrentes da perda de células nervosas podem abranger várias áreas, como no caso da atrofia multissistêmica, e variarem de acordo com o progresso da doença (PRZEDBORSKI; VILA; JACKSON-LEWIS, 2003).

É comum em grande parte das doenças neurodegenerativas o aparecimento de gliose reativa, alterações morfológicas nos neurônios residuais, fragmentação de organelas, condensação da cromatina nos locais onde há perda/morte de neurônios (CLARKE, 1999).

Fundamentalmente, são considerados dois tipos de morte celular: apoptose e necrose. Entretanto, para neurônios, resumir esta ocorrência a somente estes dois mecanismos é inapropriado e, deveras simplista (YAGINUMA et al., 1996). Pelo menos podem ser citados quatro eventos quando se tratam de neurônios: morte citoplasmática, autofagia, apoptose e necrose, possuindo cada

evento diferentes mecanismos moleculares envolvidos (PRZEDBORSKI; VILA; JACKSON-LEWIS, 2003).

Durante o estágio de desenvolvimento embrionário, para que sejam estabelecidas sinapses de tamanho e funções normais, faz-se necessário que o excesso de células seja eliminado através, por exemplo, de processos de morte celular como a autofagia (MARTIN et al., 2015). Todavia, devido à alta demanda energética e proteica, elevada quantidade de mitocôndrias e ribossomos presentes nos neurônios, este tipo de célula torna-se muito susceptível à disfunção autofágica (SON et al., 2012). A autofagia pode ser dividida em três tipos dependendo do modo de entrega do conteúdo a ser degradado no lisossomo: micro autofagia, autofagia mediada por chaperona e macroautofagia.

Em relação à morte celular, os dois principais mecanismos são a necrose e a apoptose, onde o primeiro ocorre por danos causados por trauma e o último em decorrência de programação genética. No caso de diversas patologias humanas, entre elas as doenças neurodegenerativas, tanto a necrose quanto a apoptose estão envolvidas (TROULINAKI; TAVERNARAKIS, 2012). Quando uma célula entra em processo de necrose, devido à liberação do conteúdo citoplasmático haverá ao redor de seu microambiente inflamação. Geralmente, a necrose, sobretudo por seu caráter agudo, uma vez iniciada não oferece oportunidades de recuperação celular (GORMAN, 2008). Aspectos morfológicos distinguem a necrose da apoptose, entre eles: integridade da membrana, inibição da Nec-1 e aumento de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, há características comuns, entre elas, o processo de proteólise por estresse ou inflamação, na qual a morte celular pode ser sinalizada por sinais pró-apoptóticos celulares extrínsecos ou intrínsecos como infecções virais ou danos de origem molecular (SHAO et al., 2017)

Assim, são intrigantes a diversidade, a complexidade e as distinções moleculares dos mecanismos envolvidos nos diferentes tipos de morte celular, bem como, a necessidade dos mesmos para nossa homeostase geral. Do mesmo modo, disfunções nestes processos, sobretudo na apoptose, podem dar início as diferentes doenças que afetam o SNC, incluindo as doenças neurodegenerativas (SOLANKI; PARIHAR; PARIHAR, 2016; MARTIN; WONG, 2017).

A inflamação, assim como vários dos eventos expostos acima, tem papel importante no surgimento e progressão das principais doenças neurodegenerativas (CUNNINGHAM, 2012).

Como dito anteriormente, o nosso cérebro e suas células são particularmente sensíveis às modificações de seu microambiente. O nosso SNC é composto por mais de 100 bilhões de neurônios e quantidade similar de células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia). As células da glia monitoram o microambiente através da interação com as proteínas CX3CL1 e CD200 de origem neuronal (FISCHER; MAIER, 2015).

Alguns tipos de células da glia são células imunes inatas do cérebro e respondem mediante agressões por injúria e infecções, além de serem responsáveis pelo suporte de células do SNC e eliminação de sinapses desnecessárias durante o desenvolvimento embrionário ou início da infância (NORDEN; MUCCIGROSSO; GODBOUT, 2015).

Qualquer alteração decorrente de infecção ou dano neuronal, desde que em quantidade suficiente levará as células da glia a um estado denominado micróglia, ativação dos astrócitos e por fim neurotoxicidade. Estas células dependendo da extensão dos danos produzirão e liberarão fatores neurotróficos, citocinas e espécies reativas de oxigênio, levando ao recrutamento de células do sistema imune, desenvolvimento de reação inflamatória e neurodegeneração (BURGUILLLOS et al., 2011). Embora possam ser prejudiciais para os neurônios e astrócitos, a liberação de tais fatores pela micróglia em níveis normais desempenha papel fundamental na remoção de debris celulares e liberação de fatores neurotróficos essenciais para a regeneração do tecido (GONZÁLEZ et al., 2014). De fato, durante processos de injúria celular, ocorre a liberação de fatores associados a patógenos ou moleculares associados ao perigo, os quais são reconhecidos pelos receptores TLRs amplamente presentes nas células da glia. Sob mediação de tais receptores, estas células liberarão fatores de sobrevivência que se presentes em excesso levarão ao aumento da inflamação e dano neuronal (FISCHER; MAIER, 2015).

Diversos fatores moleculares regulam a atividade da micróglia de maneira muito ajustada, tal ajuste fino se deve ao elevado potencial de dano tecidual

devido à baixa capacidade para regeneração e reparo cerebral. A mínima alteração no equilíbrio do SNC inicia a ativação da glia, onde é possível, primeiramente, observar mudança em sua morfologia, diferença de expressão de moléculas intracelulares pró ou anti-inflamatórias e antígenos de superfície (PERRY; HOLMES, 2014).

Alguns tipos de células da glia, comumente chamadas de macrófagos do SNC, derivam-se, durante o desenvolvimento embrionário, do saco vitelínico e colonizam o parênquima cerebral permanecendo aí por todo período de vida de um indivíduo adulto. Assim como para as subpopulações de macrófagos em outros órgãos, que recebem denominações para distingui-los nos casos de citotoxicidade ou reparo, as células da glia são chamadas de M1 ou M2, respectivamente, para esses tipos de eventos no SNC (TANG; LE, 2016).

A descoberta do fenômeno de ativação da micróglia foi através de estudo com animais que tinham o cérebro afetado por príons e que foram desafiados, de modo a mimetizar infecções, por meio da utilização de lipopolissacarídeos. Este fato tem sido observado em animais modelos das doenças de Parkinson e Alzheimer, todavia, com particularidades moleculares e fenotípicas (PERRY; HOLMES, 2014). Como dito, as células da glia são fundamentais tanto na produção de substâncias pró-inflamatórias, (IL)-1 β e IL-6, quanto de moléculas anti-inflamatórias e regulatórias (IL-10 e IL-4). Por causa de sua estabilidade e longevidade, estas células estão mais susceptíveis aos danos oxidativos ou em nível de DNA e, qualquer disfunção pode acarretar prejuízos à manutenção cerebral, principalmente, devido ao processo natural de envelhecimento (NORDEN; MUCCIGROSSO; GODBOUT, 2015).

Estudos em modelos animais de DA mostraram aumento de micróglia ativada e, portanto, mudança em sua morfologia e maior expressão de marcadores imunes do complexo de histocompatibilidade (MHC-II), principalmente, em regiões onde havia maior deposição e formação de placa β -amiloide (KOENIGSKNECHT-TALBOO et al., 2008). Assim, como em animais idosos, modelos animais com DA apresentaram de maneira parecida ou aumentada a expressão de marcadores de inflamação de superfície (CD68 e MHC II).

A participação da neuroinflamação na DA ainda não é conclusiva, entretanto, é sabido que o declínio cognitivo e a sinalização neuronal são prejudicados não somente pelo acúmulo de placas β -amiloides, mas sobretudo pela não remoção destas placas do tecido (KATSNELSON; STROOPER; ZOGHBI, 2016). Existem alguns genes de risco para o desenvolvimento da DA (TREM2 e CD33), os quais estão também relacionados em desempenhar a função de fagocitose na micróglia e, portanto, reparo. Cérebros envelhecidos ou portadores de doenças neurodegenerativas encontram-se em prejuízo de suas funções normais e, conseqüente, remoção de agregados proteicos por parte da micróglia (NORDEN; MUCCIGROSSO; GODBOUT, 2015). Um exemplo de modulação com envolvimento de tipo celular não neuronal (astrócito) na DA envolve o gene APOE onde o seu alelo ϵ 4 aumenta o risco para o desenvolvimento da doença e agregação proteica, e o alelo ϵ 2 diminui o risco por meio do clearance proteico (KATSNELSON; STROOPER; ZOGHBI, 2016). Ainda segundo Katsnelson et al. (2016), outro exemplo de envolvimento em doenças neurodegenerativas de células não neuronais se dá na esclerose lateral amiotrófica, na qual astrócitos derivados de indivíduos portadores de mutação no gene que codifica a proteína superóxido dismutase 1 (SOD1) liberam fatores tóxicos que induzem a morte de neurônios motores.

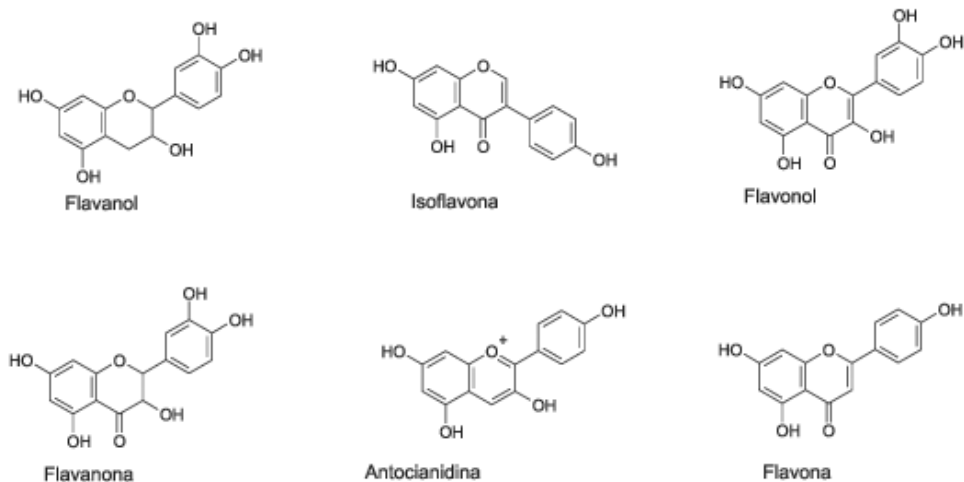
Finalmente, os astrócitos, um dos tipos de células da glia, são os responsáveis por inúmeras funções no cérebro, tais como, eliminar sinapses, auxiliar na manutenção do equilíbrio de água, íons, neurotransmissores (glutamato), pH e parecem estar envolvidos diretamente na progressão/ início das doenças neurodegenerativas (VERKHRATSKY et al., 2014; PHATNANI; MANIATIS, 2015). Através de enzimas específicas e receptores, os astrócitos suportam os neurônios com glutamina (precursor dos neurotransmissores GABA e glutamato), sendo, portanto, essenciais para a ocorrência de sinapses e homeostase desses neurotransmissores, uma vez que os neurônios em si não possuem maquinário para sua produção de novo (VERKHRATSKY et al., 2014).

A ausência de mitoses e, portanto, impossibilidade de “diluir” os agregados proteicos, o desconhecimento acerca do início, progressão e manutenção das doenças neurodegenerativas, assim como a já relatada ausência de tratamentos efetivos/seguros tem encorajado grupos de pesquisas a buscarem classes de

substâncias que sejam anti-inflamatórias e/ou antioxidantes como potenciais ferramentas farmacológicas no entendimento e tratamento de tais doenças (PARASURAMAN; DAVID; ARULMOLI, 2016).

Uma classe de substâncias que reúne tais propriedades são os flavonoides, que se dividem de acordo com a estrutura química em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavan-3-ols, antocianinas e isoflavonas (figura 1A) (A BALENTINE et al., 2015). São oriundos do metabolismo secundário de plantas e possuem pelo menos um anel aromático em sua estrutura ao qual uma ou mais hidroxilas estão ligadas. Os flavonoides possuem dois anéis aromáticos os quais são ligados a outro anel contendo um átomo de oxigênio heterocíclico (AMBRIZ-PEREZ et al., 2016).

Figura1A. Exemplo de estruturas químicas de tipos de flavonoides.



A classe dos flavonoides possui até o momento cerca de 10 mil compostos identificados. Suas principais funções nas plantas são proteção frente à radiação UV, pigmentação, atividade antioxidante, antiviral e antimicrobiana (KOZŁOWSKA; SZOSTAK-WĘGIEREK, 2014). Ainda segundo Kozłowska e Szostak-węgierek (2014), todos os flavonoides possuem como característica comum 3 grupamentos hidroxila, sendo dois deles no anel A nas posições 5 e 7 e, o outro na posição 3 do anel B.

Os flavonoides estão presentes em frutas, chás, vegetais, sementes e nozes, nos quais estão, principalmente, na forma de glicosídeos. Como visto

anteriormente, as subclasses de flavonoides possuem uma estrutura química em comum. Todavia, alterações nas posições, números e tipos de substituintes influenciam e diferenciam suas atividades biológicas, sobretudo, em termos de potência farmacológica (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Há atualmente uma relação positiva entre altas ingestões de flavonoides e efeito profilático frente diminuição nas taxas de doenças crônicas tais como diabetes, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e inflamação (AMBRIZ-PEREZ et al., 2016).

Ainda segundo AMBRIZ-PEREZ et al. (2016) para que exista ação anti-inflamatória, é necessário que o composto fenólico possua: um sistema de anéis planares, insaturação no anel C como carbonila cetônica no C4 e/ ou dupla ligação em C2-C3, grupos hidroxila no anel B em C5 e C7 no anel A, número e posição das hidroxilas como grupo catecol no anel B, metilação do grupo hidroxila nas posições 3,5 ou 4' melhoram a atividade, moléculas não-glicosiladas tem melhor efeito que as glicosiladas.

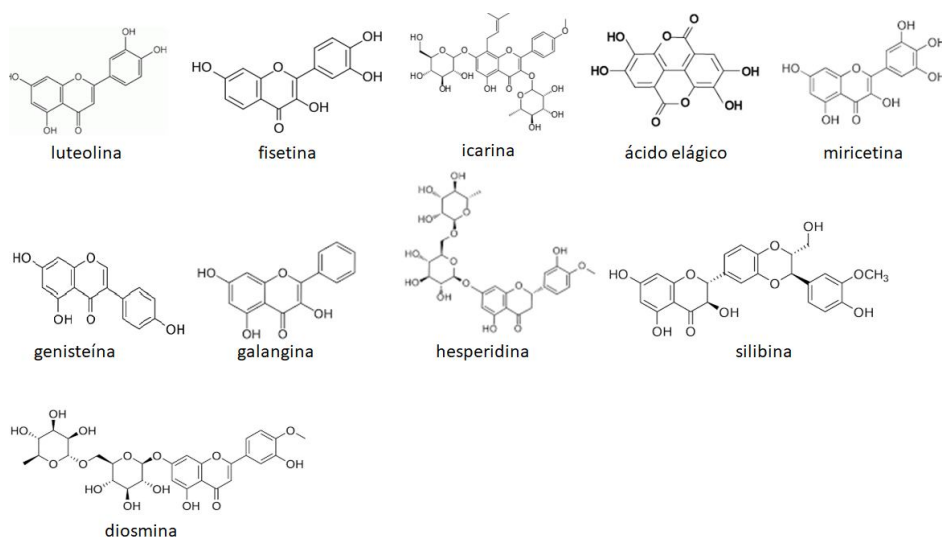
Há um grande número de trabalhos que apontam os flavonoides como capazes de eliminar radicais livres, envolvidos na saturação de oxigênios singletes (COS et al., 2000), quelação de metais de transição (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002) e inibição de diversas enzimas envolvidas em processos biológicos como inflamação e geração de espécies reativas de oxigênio (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002). Como dito, há evidências de estudos clínicos e epidemiológicos que apontam a relação entre o consumo alimentar de compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, e o retardo e prevenção do início de doenças degenerativas (LI et al., 2014). Com efeito, em relação às doenças neurodegenerativas, vários trabalhos *in vitro* demonstram proteção dos flavonoides frente às doenças de Alzheimer (ONO et al., 2003; ZENG, 2004; CURRAIS et al., 2013), Parkinson (LEVITES et al., 2001; KIM et al., 2012; LV et al., 2012; NIE; CAO; ZHAO, 2013) e Huntington (EHRNHOFER et al., 2006; KUMAR; KUMAR, 2009; SANDHIR; MEHROTRA, 2013).

Estudos moleculares demonstraram que compostos fenólicos exibem ação modulatória na célula em uma enorme variedade de alvos determinantes na maquinaria celular tais como ativação da proteína quinase ativada por mitógeno

(MAPK), proteína quinase C (PKC), serina/treonina proteína quinase Akt/PKB, enzimas desintoxicantes antioxidantes da fase II, regulação negativa de enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS) através da ativação do peroxissomo do gamma receptor ativado por proliferador (PPAR γ), regulação da homeostase do cálcio, inibição do fosfoinosítídeo3-quinase (PI 3-quinase), tirosina quinases, NF-kB, c-JUN, bem como modulação de vários genes de sobrevivência do ciclo celular (SOBRATTEE et al., 2005).

Para o presente estudo, diferentes tipos de flavonoides foram criteriosamente selecionados para avaliação de suas capacidades protetoras de células neurais desafiadas por excitotoxicidade disparada por glutamato. Dentre os critérios de escolha, prevendo originalidade, foram elencadas substâncias baseadas na representação de algumas classes de flavonoides flavona (luteolina, fisetina e diosmina), flavonol (galangina, miricetina, icarina), polifenol (ácido elágico), isoflavona (genisteína), flavanona (hesperidina) figura 1B. Além da representação de diferentes classes e de suas diversidades, os flavonoides foram escolhidos com base nas suas potenciais e/ou já comprovadas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, levando-se em consideração as premissas estruturais (sobretudo quanto aos anéis e seus radicais substituintes) descritas criteriosamente por AMBRIZ-PEREZ et al. (2016).

Figura 1B. Estrutura química dos flavonoides utilizados no presente trabalho.



No que tange a plataforma de estudo utilizada neste trabalho são aplicadas células neurais diferenciadas a partir de células PC12. Sobre estas células são estudados diferentes parâmetros bioquímicos na presença ou ausência de diferentes concentrações de cada flavonoide em estudo. Isto visa, conforme dito, avaliar as potencias atividades neuroprotetoras destes flavonoides, em nível celular, sob diferentes variáveis bioquímicas cuja excitotoxicidade mediada por glutamato possa ter influência na neuroinflamação característica de diferentes doenças neurodegenerativas.

Neste contexto, é imperativo atentar para o fato de que grande quantidade de informação acerca do desenvolvimento e manutenção de células neurais provém de diferentes estudos *in vivo*. Contudo, diante do aumento do rigor no uso de animais e o elevado custo para os cuidados e criação/hospedagem associado, a busca por métodos mais eficientes tem sido encorajada (SHARMA et al., 2011; DOKE; DHAWALE, 2015).

Dentre as alternativas mais utilizadas podemos citar a cultura de células e tecidos (DOKE; DHAWALE, 2015). Existem várias linhagens celulares que visam mimetizar o que ocorre no cérebro em termos de patologia e de seu funcionamento normal. Dentre os modelos celulares mais utilizados para ensaios *in vitro* para avaliação de potencial neurotóxico (XIAN et al., 2013), danos oxidativos e influência de outros fatores presentes em doenças neurodegenerativas está a linhagem celular PC12 (FU et al., 2014; FABRIZI et al., 2014). A PC12 pode ser diferenciada em células “neuron-like” mediante exposição ao fator de crescimento neuronal (NGF). A diferenciação destas células pode ser mensurada através de parâmetros morfológicos semiquantitativos e quantitativos diversos (DAS, 2004). O que torna essa linhagem celular atraente para esses tipos de estudos é a capacidade de apresentar estruturas em forma de vesículas parecidas com as sinápticas, aumentada excitabilidade elétrica, não ocorrência de mitose e extensões de neuritos, aspectos que se assemelham a aqueles que caracterizam diferentes células neurais (MENDONÇA et al., 2013).

Em doenças neurodegenerativas, é observada a morte neuronal e, portanto, mimetizar *in vitro*, a perda neuronal ou a proliferação de neuritos, provocada por agentes citotóxicos ou neuroprotetores, respectivamente, é

fundamental, sendo esses eventos possíveis de serem observados em PC12 diferenciada ou não (CHAURASIYA; SHUKLA; TEKWANI, 2017). Isto torna nossa plataforma de estudo atraente e variada, o que por sua vez permite a coleção de diferentes dados que sejam complementares entre si através de diferentes ensaios bioquímicos e de biologia celular.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito neuroprotetor de diferentes compostos fenólicos (genisteína, galangina, luteolina, ácido elágico, fisetina, icarina, diosmina, silibina, mircetina e hesperidina) sobre células *neuron-like* desafiadas por excitotoxicidade mediada por glutamato através da combinação de diferentes ensaios bioquímicos e de biologia celular que sejam complementares entre si.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a neuroproteção em nível celular oferecida pelos diferentes compostos fenólicos em linhagem PC 12 diferenciada desafiada por excitotoxicidade glutamatérgica através de ensaios de viabilidade celular – Teste do MTT (ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) (,5-difeniltetrazólio);
- Avaliar a integridade da membrana celular de células desafiadas por excitotoxicidade na presença ou ausência dos diferentes compostos fenólicos através do ensaio da Lactato Desidrogenase;
- Mensurar os níveis de espécies reativas de oxigênio em células desafiadas por excitotoxicidade na presença ou ausência dos diferentes compostos fenólicos através do teste do DHE (dihidroetídeo);
- Avaliar a proteção de células desafiadas por excitotoxicidade frente aos diferentes compostos em teste no que se refere aos tipos de morte celular (necrose e apoptose) por meio de citometria de fluxo;

- Quantificar e avaliar a influência dos níveis de TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-7 e IL-10 em células desafiadas por excitotoxicidade na presença ou ausência dos diferentes tipos de compostos em teste.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram adquiridos glutamato (CAS Number 49621) Sigma-Aldrich®, o Nerve Growth Factor (NGF) da Sigma Aldrich de *Vipera lebetina venom* (CAS Number 9061-61-4) e a linhagem celular PC-12 utilizada (CRL-1721, feocromocitoma de ratos) foi obtida da ATCC (Coleção Americana de Cultura de Células). Os compostos fenólicos ensaiados foram: fisetina (Sigma Aldrich, lote 100M1419V), icarina (Cayman Chemicals, lote 04159175), diosmina (Sigma Aldrich, lote MKBW6791V), hesperidina (Sigma Aldrich, lote SLBP3689V), silibina (Sigma Aldrich, lote BCBV3781), ácido elágico (Cayman Chemicals, lote 0423046-3), luteolina (Sigma Aldrich, lote L9283), genisteina (Cayman Chemicals, lote 17133327), galangina (Sigma Aldrich, lote MKBD2845) e mircetina (Cayman Chemicals, lote 041482215), todos com certificados de pureza e identidade fornecidos pelo fabricante. Outros reagentes foram de grau analítico.

3.2 Cultivo celular

3.2.1 Manutenção da linhagem de células PC-12

A linhagem celular foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO – dimetilsulfóxido - e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos, as linhagens foram descongeladas e cultivadas em monocamada em frascos de 25 cm³ com 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) + 0,2% de DMSO, uma vez que este solvente foi utilizado para solubilizar os flavonoides. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C até que atingissem o estado de confluência (~ 5×10^6 células), condição na qual era requerido o subcultivo.

3.2.1.1 Subcultivo da linhagem de células em suspensão e semi-aderentes

A linhagem PC-12 tem como característica se aderir ao fundo do frasco. Uma vez desfeitas essas ligações, o conteúdo do frasco foi recolhido e levado à centrifugação por 5 min por 900g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1mL de meio DMEM suplementado com 10% SBF+ 0,2% de DMSO. O conteúdo foi então dividido em mais 2 garrafas de cultura de 25 cm³ com 5 mL de meio nas mesmas condições descritas acima.

3.3 Ensaios biológicos

3.3.1 Indução de crescimento de neuritos e diferenciação de PC12.

As células PC12 foram incubadas por 24 horas para adequada adesão. Subsequentemente, as células foram tratadas com NGF (“Nerve Growth Factor de *Vipera lebetina venom*”, 100 ng/mL) e incubadas por um período de 6 dias (144 h), nas mesmas condições descritas acima. A neuritogênese foi avaliada a cada 24h por microscopia óptica invertida com contraste de fase (Aumento: 250x), com 10 fotomicrografias/poço a cada 24h de incubação. Apenas células com pelo menos um neurito de comprimento igual ou superior ao do diâmetro do corpo celular foram consideradas diferenciadas para *neuron-like* (Das et al., 2004).

3.3.2 Viabilidade celular

Antes da realização de qualquer experimento foi realizado o teste de viabilidade das células utilizadas, visando garantir a confiabilidade dos resultados. Para tanto, foi realizado o teste por azul de Tripán. O corante azul de Tripán foi utilizado na proporção de 1:2, pipetando 20µL de corante para 10µL de suspensão de células e aguardando 15 minutos para a leitura no microscópio. As células viáveis não são coradas pelo azul de Tripán e aparecem incolores, ao passo que as células mortas, cujas as membranas se mostram fragilizadas e captam o corante, apresentam coloração azul. Para a realização de todos os experimentos, foram utilizadas as culturas com viabilidade por azul de Tripán igual ou superior a 98%.

3.3.3 Ensaios de viabilidade celular (MTT)

Para o teste de viabilidade celular foram utilizadas placas de 96 poços, de modo que os 3 primeiros poços foram utilizados para a leitura do branco e, portanto, não receberam células ou tratamento. O restante dos poços recebeu 5×10^4 células/poço, sendo o volume de meio final de 200µL. Após 24 horas de incubação (37°C com 5% de CO₂), os poços receberam os tratamentos em triplicata, sendo a placa incubada novamente por 24 horas. No fim deste período, os poços receberam 20µL de reagente MTT, seguindo-se nova incubação de 3 horas nas mesmas condições supracitadas.

Em seguida, as placas foram centrifugadas à 5min x 900g e, posteriormente, invertidas para o descarte do sobrenadante. Acrescentou-se 200µL de DMSO, sendo então as placas levadas para agitação até a total dissolução dos reativos cristais (aproximadamente 20 minutos). Posteriormente, foram posicionadas no espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 570 nm. Os resultados obtidos foram coletados e transferidos para o software GraphPad Prism 7, comparados entre grupos controles e experimentais e analisados estatisticamente (MOSSMAN, 1983).

3.4 Teste para avaliação da Lactato Desidrogenase (LDH)

Os experimentos foram realizados em triplicata em placas de 96 poços, com número médio de 10.000 células para 200 µL de meio de cultura. Os ensaios foram realizados de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante (CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay- lote 325352, Promega) na presença ou ausência dos diferentes compostos fenólicos em teste. Brevemente, para determinar a atividade LDH, foram subtraídos os valores de absorção em 680nm (sinal de fundo do equipamento) do valor de absorção em 490nm.

O cálculo da porcentagem de citotoxicidade para cada tratamento foi:

$$\% \text{ de citotoxicidade} = \frac{\text{valor experimental} - \text{células efetas controle espontâneo} - \text{células alvo controle espontâneo}}{\text{Controle máximo da célula alvo} - \text{Controle espontâneo das células alvo}} \times 100$$

Controle máximo da célula alvo - Controle espontâneo das células alvo

3.5 Ensaio para detecção de espécies reativas de oxigênio (DHE)

Foram plaqueadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços. Foram designados poços controle positivo (glutamato 13 mM), controle negativo (meio de cultura e DMSO 0,2%) e tratamentos com os diferentes compostos fenólicos. Para a realização do ensaio, o meio de cultura foi retirado e adicionado 1 mL de PBS, com o intuito de lavar os poços e remover resíduos de debris e/ou meio de cultura. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de DHE na concentração de 1×10^{-6} μ M em cada poço seguido de incubação por 30 minutos a 37° C. Após o período de incubação, foram aspirados todo o conteúdo de cada poço e, novamente, adicionados 1 mL de PBS.

Por último, a placa teve sua leitura mensurada no comprimento de onda de excitação de 480 – 520nm e também no comprimento de onda de emissão de 570-600nm, no que os resultados foram comparados entre grupos controles e experimentais.

3.6. Avaliação de morte celular

3.6.1 Citometria de fluxo

Em uma placa de 24 poços foram utilizadas 5×10^5 células PC12 diferenciadas para um volume final de 3 mL de meio. Tais células foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram tratadas com os diferentes compostos fenólicos em teste. Após este tempo, as células foram recolhidas dos poços e centrifugadas a 900g x 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado e acrescido de 1 mL de PBS. Na sequência, foi feita nova centrifugação a 900g x 5 minutos, novamente o sobrenadante foi desprezado, o pellet ressuscitado e adicionados 100 μ L de tampão 1x de anexina V. Em seguida as células foram submetidas a nova centrifugação seguindo as mesmas condições, com ressuspensão de células e acréscimo de 5 μ L de anexina V FITC.

As amostras foram incubadas por 15 minutos em banho de gelo, após, foram adicionados 500 μ L de tampão anexina V. Estas amostras foram transferidas para tubos de citometria aos quais foram adicionados 1 μ L de iodeto de propideo no momento da leitura. Foram seguidos os passos do kit de detecção

de apoptose da Sigma-Aldrich® (APOAF-20TST) e analisados 20000 eventos no equipamento FASCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Posteriormente, os dados foram transferidos e analisados no software GraphPad Prism 7 e comparados entre grupos controles e experimentais para realização das análises estatísticas.

3.7. Dosagem de interleucinas

Foram coletados os sobrenadantes de cada tratamento para realizar as análises das interleucinas. Brevemente, de acordo com o fabricante Sigma-Aldrich (Rat IL Elisa Kit), em uma placa de 96 poços, foram utilizados 100µL de cada diluição padrão de acordo com o manual do fabricante, afim de traçar uma curva de calibração.

Os sobrenadantes de cada tratamento mais os padrões foram incubados overnight a 4°C sob leve agitação. Após, foram descartadas as soluções e o material lavado com 300 µL de solução de lavagem por 4 vezes. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção biotilado em cada poço e incubada a placa por uma hora em temperatura ambiente sob leve agitação.

Em seguida foi descartada a solução e realizada nova lavagem com 300 µL de solução de lavagem por 4 vezes. Depois, foram adicionados 100 µL de HRP- estreptavidina em cada poço e incubação da placa por 45 minutos em temperatura ambiente e agitação leve. A solução foi descartada e prosseguiu-se nova lavagem. Foram adicionados 100 µL de reagente colorimétrico TMB e incubação em escuro por 30 minutos com leve agitação. Por último foram adicionados 50 µL de solução de parada seguida de leitura em espectrofotômetro a 450 nm.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo método one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Foi utilizando o software GraphPad Prism 7, (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA), adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Primeiramente, foram realizadas uma série variada de ensaios pilotos afim de se determinar a concentração ideal de glutamato a ser utilizada para o desafio de células PC12 diferenciadas com NGF nos ensaios do MTT. Nestes ensaios, foram determinados a concentração de glutamato e o tempo de exposição necessário para a indução de excitotoxicidade satisfatória, medida indiretamente pela redução da viabilidade celular. De acordo com a literatura científica, existe uma enormidade de variações de concentrações de glutamato utilizadas bem como tempos de exposição para o fim proposto. De fato, trabalhos encontrados com linhagem PC12 diferenciada apontam que estudos de viabilidade celular utilizando glutamato como agente indutor de citotoxicidade se dão na ordem de 0,01 a 30 mM (WANG et al., 2010; LIN et al., 2014; LIU et al., 2015). Em nosso trabalho, as concentrações testadas foram de 5, 10, 13, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 mM.

Para as condições de nosso trabalho, a concentração que apresentou melhor resultado para redução de viabilidade celular foi a de 13 mM. Nesta concentração apenas 64% das células PC12 diferenciadas permanecem viáveis, enquanto 36% é levada a morte, mostrando a relevância do evento lesivo mediado pelo glutamato em excesso (dados não apresentados). Foram também realizados vários ensaios com diferentes tempos de exposição ao agente agressor glutamato: 3h, 6h, 12h e 24h. O tempo de 24h foi o que apresentou melhor taxa de células mais próximas de 50% de viabilidade ou 50% de morte (dados não apresentados).

Assim, o tempo de exposição e concentração escolhidos estão em conformidade com diversos trabalhos (WANG et al., 2010; LIN et al., 2014; LIU et al., 2015). De fato, o trabalho de Lee et al., 2004, em ensaio de indução de citotoxicidade, utilizou 30 mM de glutamato após 24h para obtenção de viabilidade celular na ordem de 20%. Também de maneira muito próxima ao presente trabalho, Schelman et al., 2004 utilizaram 10 mM de glutamato para uma viabilidade em torno de 55,8% em um período de tempo de 16-24h. Resultado contrastante foi observado no trabalho de Kogo et al., 2006, onde foi observada

diminuição de viabilidade somente após a janela de tempo de 3 a 5 dias com utilização de concentrações relativamente baixas de glutamato (1 a 5 mM). Portanto, no que diz respeito à concentração ou tempo utilizado para este ensaio, verificou-se grande variabilidade destes parâmetros na corrente da literatura científica. Todavia, nossos resultados mostram a padronização de nossos métodos de desafio celular em condições satisfatórias para indução de excitotoxicidade eficiente, e melhor, de modo reprodutível e comparável à literatura científica atual.

Apesar da importância na determinação de tais parâmetros, o mais imperativo para o propósito de nosso trabalho, é a proteção celular oferecida pelos diferentes compostos fenólicos em teste quando as células PC12 diferenciadas estão expostas à agressão excitotóxica disparada por glutamato. De fato, este modelo de desafio celular tem por objetivo mimetizar o que ocorre em tecido nervoso após a exposição às altas concentrações de glutamato o que, por consequência, pode desencadear danos neuronais e perdas de células em diferentes áreas cerebrais, como demonstrado em diferentes doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2010). Isto posto, o mesmo também se torna atraente para o estudo de compostos que sejam citoprotetores/neuroprotetores em potencial. Os testes *in vitro* são atrativos em relação aqueles *in vivo*, dado a praticidade, e vantagens relativas de custo e tempo, além de reproduzirem com fidelidade os eventos moleculares que acontecem na excitotoxicidade disparada por glutamato em nível neural. Apesar de reproduzirem mais completamente o que acontece no animal como um todo, o uso de modelos animais tem sido restringido dadas as diferentes implicações éticas envolvidas na questão e o custo elevado de tais experimentos (SHARMA et al., 2011; DOKE; DHAWALE, 2015).

Na sequência do trabalho, as células PC12 diferenciadas e agora expostas a excitotoxicidade mediada por glutamato foram avaliadas na presença e ausência de diferentes concentrações dos compostos em teste, de modo a se avaliar o potencial citoprotetor, e por consequência neuroprotetor, de cada um deles.

Assim, a linhagem celular PC 12 diferenciada foi incubada por 24 horas em meio DMEM + 10% soro fetal bovino + DMSO 0,2% contendo cada um dos compostos fenólicos utilizados neste trabalho nas concentrações de 500, 250,

125, 62,5, 31,25, 15,6, 7,8, 3,9, 1,95, 1 e 0,5 μM . O potencial efeito citoprotetor de cada composto foi avaliado de modo indireto por meio da viabilidade celular apresentada nas figuras abaixo quando os dados são comparados entre grupos controles e experimentais. Com efeito, a viabilidade celular foi avaliada 24 horas após a exposição ao agente agressor glutamato na concentração de 13 mM na presença ou ausência de diferentes concentrações dos compostos em teste (Figuras 2-11). Além do controle tratado apenas com glutamato, um outro controle usado nestes testes foi a célula PC12 diferenciada não exposta a agressão induzida por este neurotransmissor, permitindo comparações mais ajustadas.

Figura 2. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de luteolina. * diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$.

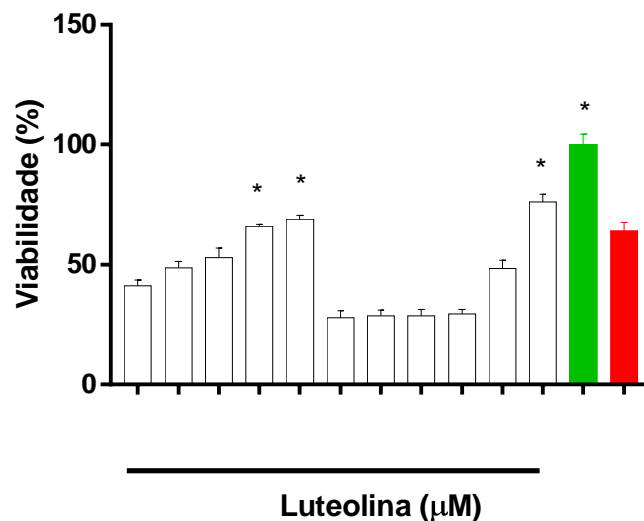


Figura 3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de fisetina. * diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

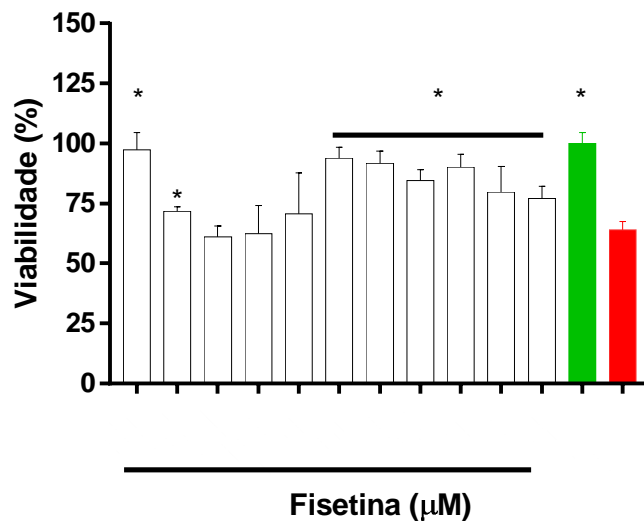


Figura 4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de icarina. * diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

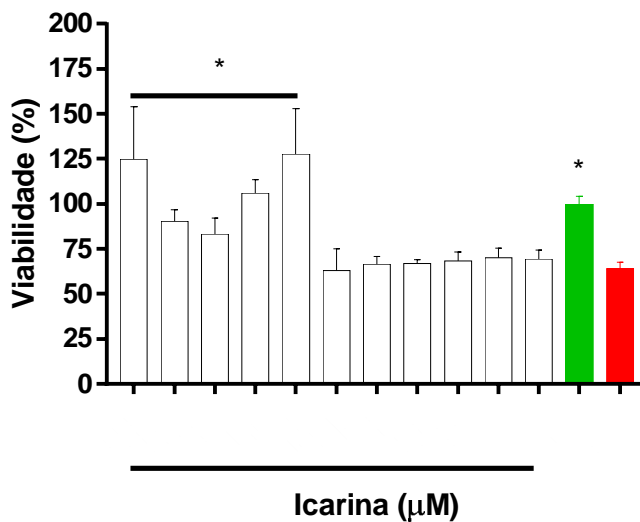


Figura 5. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de ácido elágico. * diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

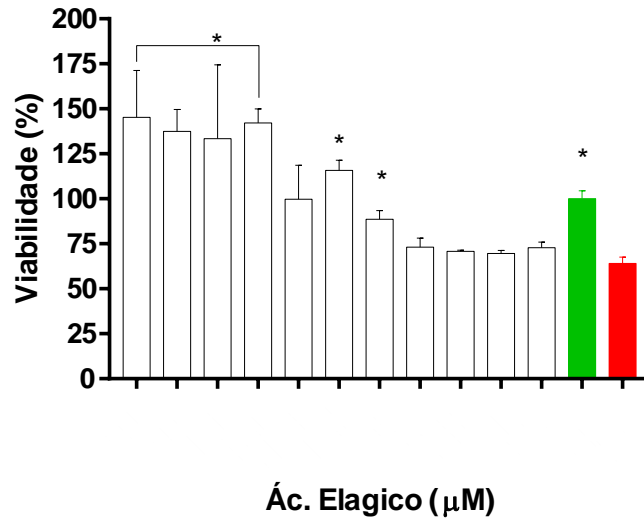


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de miricetina. *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. p<0.05

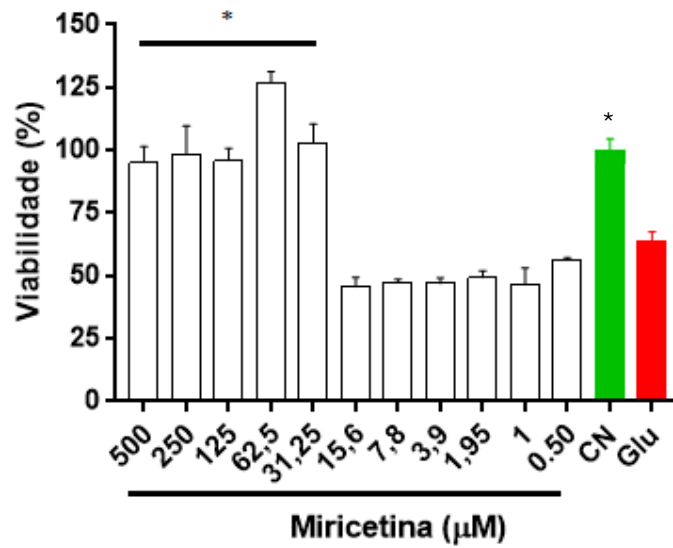


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de genisteína.
 *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

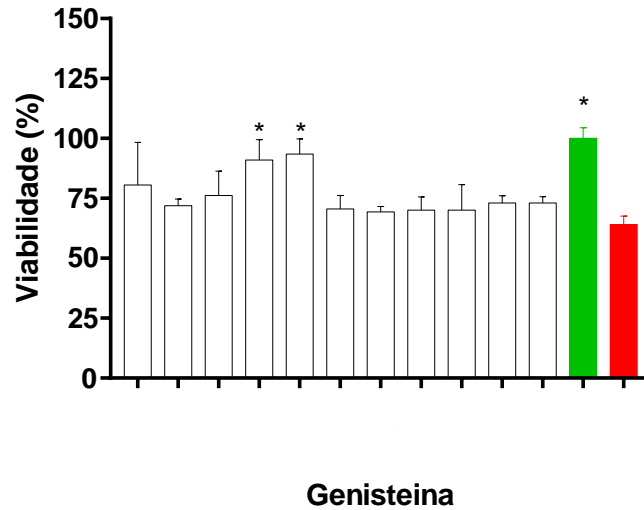


Figura 8. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de galangina.
 *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

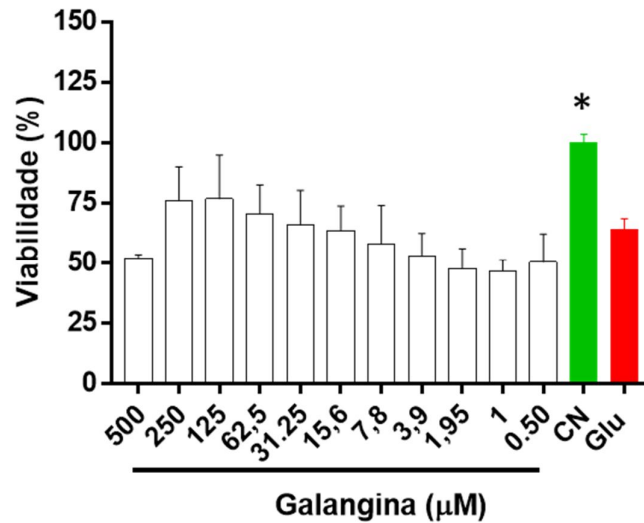


Figura 9. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de hesperidina. *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

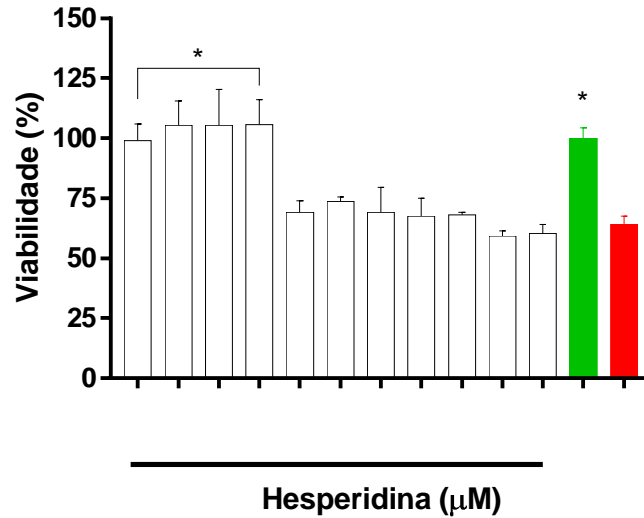


Figura 10. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de silibina. *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$

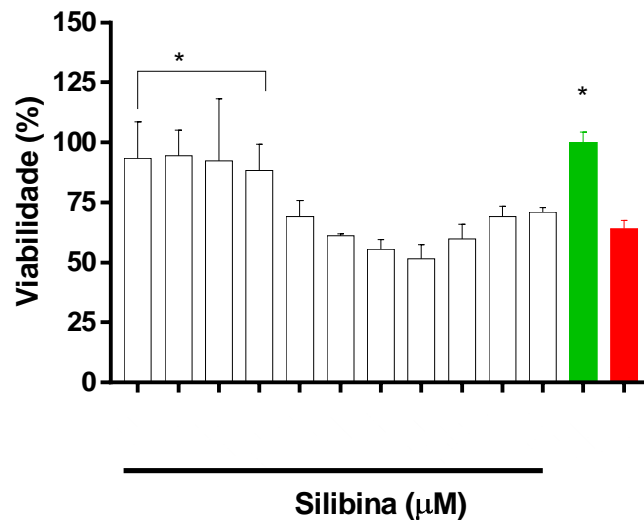
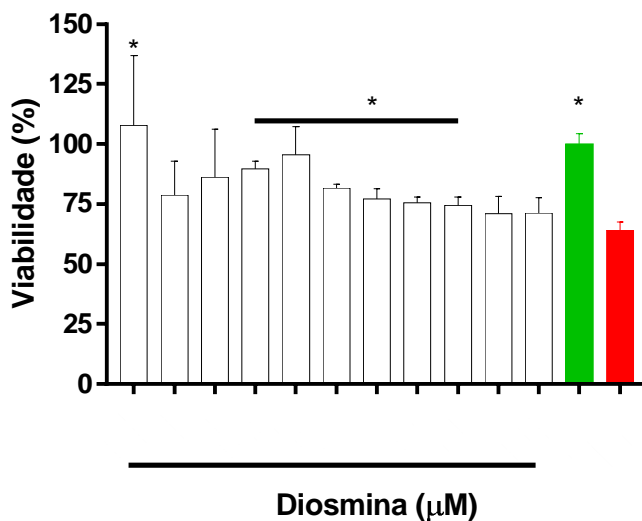


Figura 11. Ensaio de viabilidade celular (MTT) com incubação do agente agressor glutamato na presença ou ausência de diferentes concentrações de diosmina. *diferem estatisticamente do controle tratado apenas com glutamato. $p < 0.05$



Os resultados mostram que os compostos fenólicos luteolina (Figura 2), fisetina (Figura 3), icarina (Figura 4) ácido elágico (Figura 5) miricetina (Figura 6), genisteína (Figura 7), hesperidina (Figura 9), silibina (Figura 10), diosmina (Figura 11), especialmente nas concentrações mais altas, aumentaram a viabilidade celular em relação ao controle de células desafiadas por glutamato. Para maioria dos casos, nem todas as concentrações utilizadas de cada composto foram eficientes em reduzir a morte celular disparada por glutamato, indicada potencial e indiretamente pelo teste do MTT. Num comparado geral das diferentes concentrações, a galangina e a genisteína parecem não terem tido efeito ou exibiram pouco efeito quando comparadas aos outros compostos ensaiados, particularmente contra fisetina e diosmina, que apresentaram melhores resultados. Este tipo de variação dos dados é comum entre diferentes compostos quando comparados de modo quali/quantitativos, ainda que pertencentes a uma mesma classe fitoquímica. Isto é esperado, a considerar a variabilidade estrutural entre eles, com diferentes impactos no desempenho farmacológico sob avaliação. Ainda que pertencentes a uma mesma classe fitoquímica, a classe é

suficientemente diversa em diferentes subclasses, de modo a explicar tal variabilidade de desempenho (CHEN et al., 2017).

Para algumas das concentrações testadas de ácido elágico, icarina e miricetina, a porcentagem de viabilidade superou aquela do controle negativo, o que pode ser interpretado como artefato experimental decorrente de aumento de atividade mitocondrial ou interferência na leitura espectrofotométrica causadas pelas drogas, dentre outras possibilidades a serem melhor investigadas futuramente.

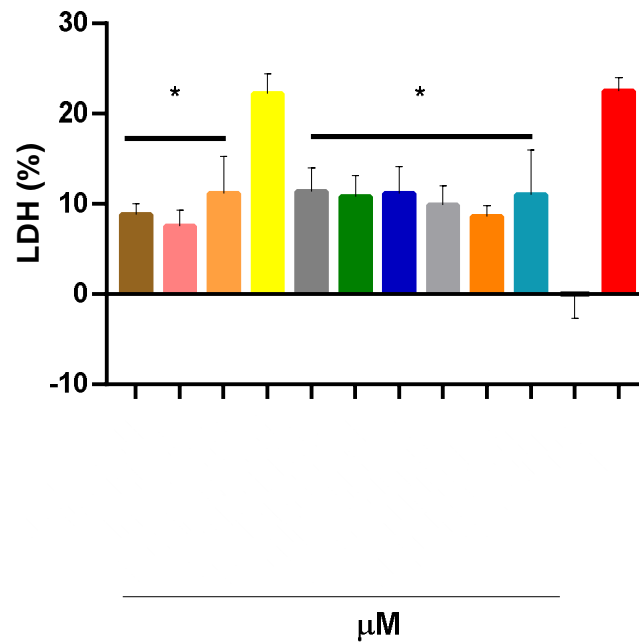
De todo modo, e em especial nas concentrações mais altas, a maioria dos compostos em teste parecem exercer maior ou menor efeito citoprotetor em células PC12 diferenciadas expostas á excitotoxicidade mediada pelo glutamato. Em trabalhos deste tipo, o próximo passo é avaliar o mecanismo molecular/celular, pelo qual esta proteção acontece. Neste ponto, diferentes ensaios bioquímicos foram realizados para este fim, como por exemplo, o teste do LDH, o teste do DHE, a citometria de fluxo e a dosagem de citocinas, como disponíveis abaixo. Afim de otimizarmos o uso dos compostos dada a limitação de suas quantidades disponíveis e custos, para estes testes descritos abaixo, foi empregado o valor de DE_{50} para cada um dos compostos em teste, calculado a partir de regressão linear dos dados obtidos no ensaio do MTT.

4.2 Teste para avaliação da Lactato Desidrogenase (LDH)

O ensaio que mede a atividade da LDH presta como um marcador eficiente da ruptura e/ou danos da membrana citoplasmática. Para células PC12, especialmente nas diferenciadas, o nível de ruptura da membrana é bastante variável, a depender da concentração de glutamato utilizada, tempo de exposição á excitotoxicidade e, sobretudo, número da passagem celular. De acordo com as condições de nossos experimentos, o glutamato parece pouco interferir no processo de ruptura de membrana, o aumentando em apenas cerca de 20-25% em relação ao controle negativo. Porém, todos os compostos (exceto ácido elágico) em seus respectivos valores de DE_{50} diferem significativamente do grupo controle tratado por glutamato (Figura 12), reduzindo para cerca de 10% a ruptura de membrana causada pelo glutamato. Isto parece indicar que o efeito citoprotetor exercido, ainda que diferencialmente por cada composto no teste do MTT,

depende ao menos parcial e discretamente de um efeito protetor destes compostos na membrana ou em processos vinculados ao aumento de sua integridade.

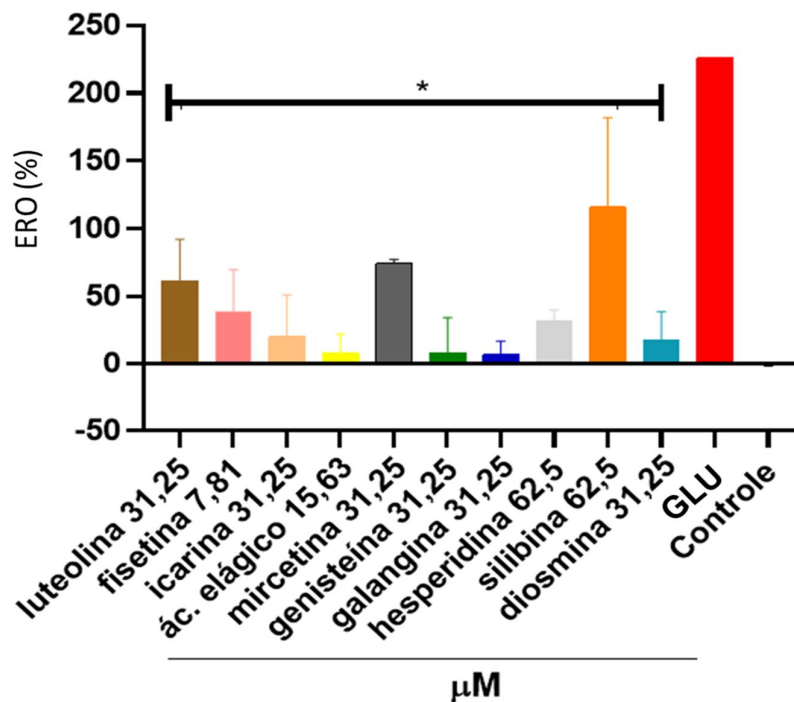
Figura 12. Ensaio da lactato desidrogenase. *diferem estatisticamente do controle positivo glutamato. $p < 0.05$



4.3 Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (DHE)

A partir deste ensaio podemos verificar que o controle negativo, assumido como 100%, e o glutamato a 13 mM apresentaram resultados bastante diferentes, visto a diferença 3 vezes maior no conteúdo de espécies reativas de oxigênio neste último quando comparado ao primeiro (Figura 13).

Figura 13. Avaliação das espécies reativas de oxigênio. * os valores diferem estatisticamente do controle positivo glutamato. $p < 0,05$



De acordo com a literatura científica acerca das doenças do SNC, quando o glutamato se encontra em excesso, há expressivo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). Isto se dá pelo influxo excessivo de íons Ca^{2+} em neurônios específicos de algumas áreas cerebrais que sejam mais sensíveis a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (LEE et al., 2004). O aumento do influxo de cálcio, e como consequência a aumentada quantidade de ERO gerada pela mitocôndria, leva ao comprometimento do potencial da membrana mitocondrial e morte neuronal, evento importante em diferentes doenças neurodegenerativas (YANS et al., 2015). Papel importante neste sentido cabe aos receptores glutamatérgicos tipo NMDA, os quais permitem o influxo de Ca^{2+} e, assim, ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e liberação de NO que levará à produção dos radicais livres (SONG; GOU; ZOU, 2017). O estresse oxidativo é associado à geração de ânions superóxidos e ERO, os quais são capazes de destruir o DNA celular, membranas e proteínas que sejam enzimas importantes para homeostase celular, levam à disfunção mitocondrial, peroxidação de lipídeos e morte celular (ZHENG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Em nossos experimentos e, apesar das diferenças de desempenho entre eles, sobretudo para miricetina e sibilina em relação as demais, todos os compostos ensaiados reduziram a formação de ERO em comparação ao grupo tratado com glutamato em quantidades relativamente equiparadas. A maioria dos compostos igualou ou quase igualou a produção de ERO exibida pelo controle negativo (Figura 13).

Estes resultados são importantes e mostram que o efeito citoprotetor, e pois potencial efeito neuroprotetor, exibido pelos diferentes compostos em teste no ensaio do MTT se devem em boa medida aos seus efeitos antioxidantes, ou seja, na redução de ERO. Isto explica ao menos em parte, o mecanismo de ação de tais compostos. De fato, é relatada na literatura a ação de diferentes flavonoides prevenindo contra este tipo de dano (GUO et al., 2012; KRASIEVA et al., 2015; HOSSEINI; SADEGHNIA; RAJABIAN, 2016; TIAN et al., 2017). É notável a quantidade de artigos que relacionam as flavonas (KRASIEVA et al., 2015; AYOABI et al., 2017), isoflavonas (LIU et al., 2018) e demais subclasses de flavonoides, ou seja, as mesmas subclasses de substâncias elencadas neste trabalho, à redução das espécies reativas de oxigênio e, pois, proteção celular.

O efeito antioxidante junto das conhecidas atividades anti-inflamatórias justificam o interesse geral em flavonoides como potenciais fármacos ou ainda quanto ao seu uso na nutracêutica. De fato, e quanto ao último quesito, flavonoides tem sido amplamente utilizados em dietas, principalmente, visando proteção contra diversas doenças, incluindo aquelas neurodegenerativas (YANS et al., 2015). O uso destes compostos em benefício da saúde humana tem sido atribuído à sua potente atividade antioxidante e, pois, capacidade de modular vias de sinalização importantes para a proteção/preservação celular, o que é corroborado no presente trabalho (ZHANG et al., 2017).

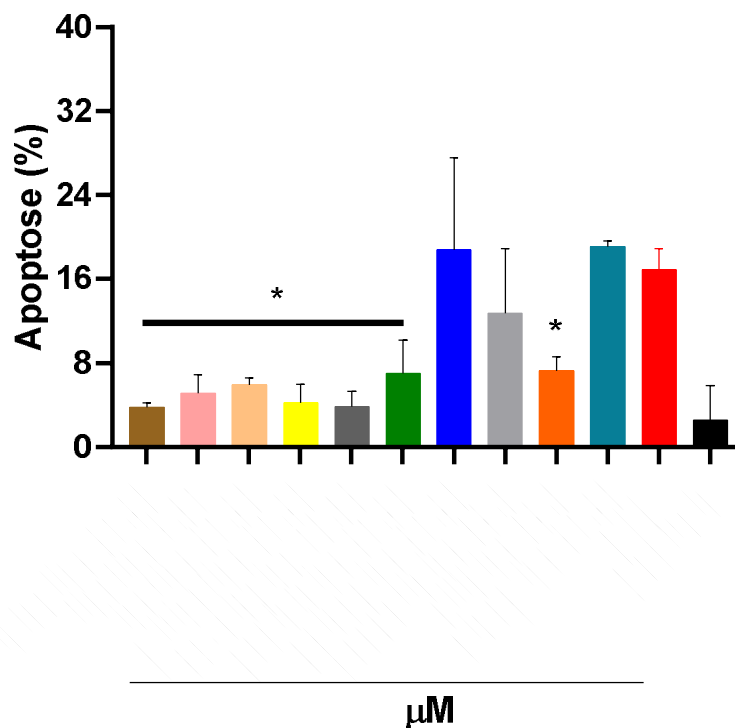
4.4 Citometria de fluxo

Os exaustivos experimentos por citometria de fluxo demonstraram outro fato apontado na literatura científica: os danos causados por glutamato aumentam a quantidade de células apoptóticas (LIU et al., 2016).

Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que o tratamento com glutamato a 13mM diminuiu a viabilidade celular quando comparada ao

controle negativo (meio de cultura + DMSO 0,2%) em termos do nível de apoptose (Figura 14).

Figura 14. Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio. * diferem estatisticamente do controle positivo glutamato



De todas as substâncias testadas as únicas que não apresentaram redução na porcentagem de células apoptóticas quando desafiadas por glutamato foram galangina, hesperidina e diosmina. Em contrapartida, as demais apresentaram proteção contra a apoptose.

Os danos oxidativos causados por glutamato em PC12 diferenciada envolvem uma cascata de eventos de regulação de genes da família Bcl-2, perda de permeabilidade da membrana mitocondrial e, posteriormente, ativação completa dos eventos mediados por caspases (HU et al., 2016), com consequente liberação de fatores inflamatórios, dentre eles várias interleucinas (ELENA et al., 2014; SHAO et al., 2017). Se houver a combinação do homodímero Bax- Bax, esta composição leva à formação de canais permeáveis de membrana e, consequente, extravasamento de citocromo C para o citoplasma e apoptose mediante ativação de caspases (ZHOU et al., 2017). No caso da apoptose, existe

amplo relato de proteção celular exibida por flavonoides de diferentes classes, o que pode se dar através da modulação de proteínas da família Bcl-2. Quando há a formação do heterodímero Bcl-2 Bax, este se liga à membrana mitocondrial e fecha o poro de permeabilidade mitocondrial de transição e evita a liberação do citocromo C e, por fim, inibe a apoptose.

Está descrito na literatura que o uso de flavonoides pode proteger contra o dano oxidativo a curto ou longo prazo, agindo diretamente como antioxidante ou modulando vias de sinalização, ou seja, diminuindo o excesso de ERO e morte neuronal, principalmente por apoptose em doenças neurodegenerativas (YANS et al., 2015; ZHANG et al., 2017). De fato, Nam et al. (2014) avaliando o efeito do flavonol taxifolina sobre as vias de sinalização apoptóticas, observaram que os níveis de proteínas pró-apoptóticas diminuíram e as suas contrapartes (anti-apoptóticas) tiveram aumento em suas plataformas celulares experimentais. Outro trabalho com flavonoide, neste caso, luteolina, demonstrou que esta diminuiu o dano induzido por 6-OHDA em PC12 através da modulação da razão Bax/Bcl-2, indicando a importância de nossos dados (GUO et al., 2012).

Isto implica que os resultados apresentados neste trabalho parecem estar relacionados entre si. Assim, os efeitos antioxidantes observados no nosso contexto experimental (teste do DHE) podem explicar o efeito anti-apoptótico (citometria de fluxo) dos diferentes compostos em teste, exceto para galangina, hesperidina e diosmina, o que por sua vez pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito citoprotetor, e pois, potencial ação neuroprotetora, exibida por tais compostos. Isto corrobora a relevância experimental do presente trabalho e ratifica a importância dos flavonoides como classe de interesse biotecnológico/farmacêutico.

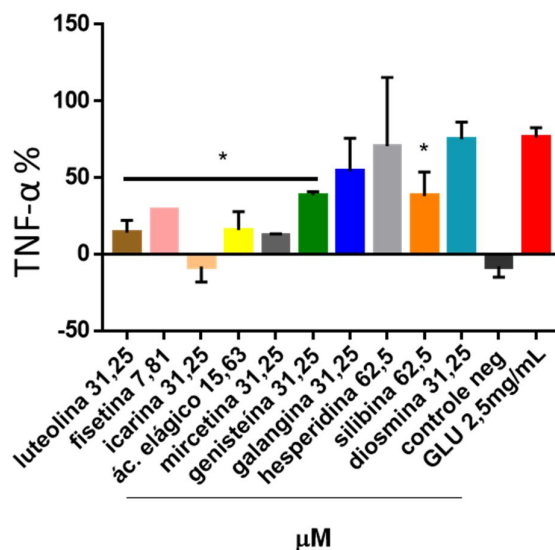
Entretanto, experimentos complementares se fazem necessários para o estabelecer definitivo desta correlação, tendo em vista que neste trabalho, não foram avaliadas as vias de sinalização pelas quais ocorre a apoptose disparada por glutamato na presença ou ausência dos compostos em teste, mas apenas o evento apoptótico em si.

4.5 Mensuração de Interleucinas

Neste trabalho foram dosadas as interleucinas TNF α (Figura 15), IL1- β , IL-6, IL-7 e IL-10. O intuito em dosar este tipo de mediador inflamatório é devido ao importante papel que desempenha a inflamação nas doenças neurodegenerativas e outras patologias que acometem o SNC. Exceto pelo TNF α , as demais interleucinas ao menos em nossas condições experimentais, não foram passíveis de detecção, por estarem em concentração menor que aquela capturada pela sensibilidade exibida pelo teste utilizado (dados não apresentados).

Figura 15. Dosagem da interleucina TNF- α . *diferem estatisticamente do controle negativo. p<0.05

Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo e incorporação de anexina V – FITC e iodeto de propídio



Pela figura 15, podemos notar que todos os compostos, exceto galangina, hesperidina e diosmina, diminuíram em diferentes magnitudes a liberação do TNF α em relação ao grupo tratado apenas com glutamato, as quais não diferiram estatisticamente do glutamato, as demais substâncias diferiram do agente indutor de agressão e se aproximaram bastante do controle negativo.

Neste ensaio o destaque ficou para a icarina a qual se assemelhou e não diferiu estatisticamente do controle negativo. Já a luteolina, a fisetina o ácido elágico, a miricetina e a genisteína em termos de porcentagem de liberação de TNF- α apresentaram em média uma redução de 62,1%, 47,46%, 60,45%, 63,84%,

37,86%, 38,42%, respectivamente, quando comparadas ao controle tratado apenas com glutamato.

Durante o processo de envelhecimento natural do cérebro, mas sobretudo em doenças neurodegenerativas, ocorre aumento da probabilidade de eventos inflamatórios que coincidem com o aumento mediadores inflamatórios tais como interleucina-1beta (IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KEMPURAJ et al., 2016).

O TNF- α é uma importante citocina que inicia a síntese de inúmeros mediadores pró-inflamatórios. Esta citocina é capaz de elicitar os dois principais mecanismos de morte celular: necroptose e apoptose. Apoptose requer a ativação de proteases específicas de aspartato da cisteína (caspases), enquanto a inibição de caspases ou a ativação insuficiente de caspases podem levar à necroptose (CIRCU; AW, 2010; LEONG; KARSAN, 2000). Dentre os ligantes que ativam receptores de morte pertencentes à super-família TNF de citocinas podemos citar o TNF- α . O receptor de morte que induz as principais funções biológicas do TNF- α é o TNFR1. A ativação deste receptor ativa uma cascata de vias de sinalização, importante tanto na sobrevivência celular quanto na indução de apoptose (CIRCU; AW, 2010).

Quando um sinal de morte é iniciado pelo TNF, este pode ser influenciado pelas ERO da mitocôndria que contribui para a apoptose através da indução da permeabilização da membrana mitocondrial exterior (MOMP) e ativação da JNK. As contribuições mitocondriais para a apoptose são controladas por membros da família de proteínas Bcl2. Somente para exemplificar, ERO induz a expressão das proteínas Bcl2 pró-apoptóticas Puma e Bim. Entretanto, as atividades pró-apoptóticas destas moléculas podem ser anuladas pelas proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Bcl2, cuja expressão é controlada pela via de sinalização de sobrevivência do NF- κ B (BLASER et al., 2016). Segundo Blaser et al. (2016), quando há maior predominância de sinais pró-apoptóticos que anti-apoptóticos, a MOMP é induzida resultando na liberação citosólica de fatores pró-apoptóticos derivados de mitocôndrias, como citocromo c e Smac / Diablo. Como resultado as caspase 9 e caspase 3 são ativadas e executam a apoptose clássica. Tais vias de sinalização são fortemente reguladas e, em indivíduos com mutações

genéticas ou animais modificados geneticamente, alterações na via de sinalização do TNF- α pode resultar em patologias severas, incluindo diferentes desordens neurodegenerativas (VARFOLOMEEV; VUCIC, 2018).

Assim, a redução nos níveis de TNF- α que por sua vez desemboca em importante efeito anti-inflamatório se soma a ação antioxidante demonstrada para boa parte dos flavonoides aqui ensaiados, justificando em boa medida, a ação de proteção celular exibida pela maioria dos compostos nos testes do MTT e por citometria de fluxo. Isto mostra que os resultados aqui apresentados se complementam e reafirmam a importância dos flavonoides como ferramentas farmacológicas importantes para o potencial avanço biotecnológico e farmacêutico. Isto inclui respaldo útil para o melhor entendimento e/ou tratamento das desordens neurodegenerativas no futuro, tendo em vista que o efeito neuroprotetor exibido por determinada droga pode ser positivo contra os danos neurais causados pelo excesso do glutamato, bastante comum em diferentes patologias.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a maioria dos diferentes compostos fenólicos aqui avaliados protegem, em diferentes níveis e magnitudes, as células PC12 diferenciadas dos danos causados pela excitotoxicidade mediada por glutamato. Este efeito foi primariamente investigado através dos ensaios do MTT, onde os diferentes flavonoides foram capazes de sustentar a viabilidade celular ainda que as células fossem expostas aos efeitos lesivos do glutamato. Na investigação do mecanismo de ação para tal atividade conclui-se que os diferentes flavonoides exercem seus efeitos citoprotetores principalmente através de suas propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórias, reveladas através do teste do DHE e dosagem do TNF- α para maioria dos compostos. Esta ação pode estar vinculada a proteção exercida pela maioria dos diferentes flavonoides frente a apoptose, como mostrado pela citometria de fluxo e indiretamente pelo teste do MTT. Isto corrobora a relevância experimental do presente trabalho e ratifica a importância dos flavonoides como classe de interesse biotecnológico e farmacêutico. Este interesse se justifica sejam os flavonoides utilizados como ferramentas no melhor entendimento da morte

neuronal como no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, uteis no tratamento de diferentes doenças neurodegenerativas, onde a excitotoxicidade mediada por glutamato seja premente e o efeito neuroprotetor oferecido por uma determinada droga seja positivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A BALENTINE, Douglas et al. Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, [s.l.], v. 101, n. 6, p.1113-1125, 8 abr. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.113.071274>.

AMBRIZ-PEREZ, Dulce L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-14, 11 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>.

Ayoobi, Fatemeh et al. Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders- a review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. v20. p604-612. 2017.

BLASER, Heiko et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends in cell biology*, v. 26, n. 4, p. 249-261, 2016.

BOYA, Patricia; REGGIORI, Fulvio; CODOGNO, Patrice. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, [s.l.], v. 15, n. 7, p.713-720, 1 jul. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2788>.

BRETTSCHNEIDER, Johannes et al. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neuroscience*, [s.l.], v. 16, n. 2, p.109-120, 15 jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3887>.

CHAURASIYA, Narayan D.; SHUKLA, Surabhi; TEKWANI, Babu L.. A Combined In Vitro Assay for Evaluation of Neurotrophic Activity and Cytotoxicity. *Slas Discovery*, [s.l.], v. 6, n. 22, p.667-675, 31 jan. 2017.

CHEN, Lei et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, [s.l.], v. 58, n. 4, p.513-527, 14 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1196334>.

CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology And Medicine*, [s.l.], v. 48, n. 6, p.749-762, 15 mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>.

CLARKE, P.G.H. 1999. Apoptosis versus necrosis. In *Cell death and diseases of the nervous system*. V.E. Koliatsos and R.R. Ratan, editors. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. 3–28

CONRAD, Marcus et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, [s.l.], v. 15, n. 5, p.348-366, 18 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2015.6>.

COS, P. et al. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONS OF FLAVONOIDS AS ANTIOXIDANT AND PRO-OXIDANT COMPOUNDS. *Studies In Natural Products Chemistry*, Antwerp, v. 22, n. 0, p.307-341, set. 2000.

CUNNINGHAM, Colm. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia*, [s.l.], v. 61, n. 1, p.71-90, 6 jun. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22350>.

CURRAIS, Antonio et al. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Aging Cell*, [s.l.], v. 13, n. 2, p.379-390, 17 dez. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/accel.12185>.

CZABOTAR, Peter E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.49-63, 20 dez. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722>.

DAS, K. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology And Teratology*, [s.l.], v. 26, n. 3, p.397-406, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2004.02.006>.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C.. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, [s.l.], v. 23, n. 3, p.223-229, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.

ELENA, Radi et al. Apoptosis and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Journal Of Alzheimer's Disease*, [s.l.], v. 42, n. 3, p.125-152, 2014. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-132738>.

ELLIS, E.f. et al. A New Model for Rapid Stretch-Induced Injury of Cells in Culture: Characterization of the Model Using Astrocytes. *Journal Of Neurotrauma*, [s.l.], v. 12, n. 3, p.325-339, jun. 1995. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.1995.12.325>.

EHRNHOFER, Dagmar E. et al. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 15, n. 18, p.2743-2751, 7 ago. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl210>.

EUROPEAN COMMISSION. Neurodegenerative Disorders. 2017. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological_en>. Acesso em: 21 abr. 2017.

FABRIZI, Cinzia et al. Lithium Improves Survival of PC12 Pheochromocytoma Cells in High-Density Cultures and after Exposure to Toxic Compounds. *International Journal Of Cell Biology*, [s.l.], v. 2014, p.1-7, 2014. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135908>.

FISCHER, Roman; MAIER, Olaf. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [s.l.], v. 2015, p.1-18, 2015. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/610813>.

FU, Xiao-yan et al. Strategy to Suppress Oxidative Damage-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Curcumin: the Role of ROS-Mediated DNA Damage and the MAPK and AKT Pathways. *Molecular Neurobiology*, [s.l.], v. 53, n. 1, p.369-378, 30 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9021-1>.

GAMMON, Katharine. Neurodegenerative disease: Brain windfall. *Nature*, [s.l.], v. 515, n. 7526, p.299-300, 12 nov. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nj7526-299a>.

GONZÁLEZ, Hugo et al. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Journal Of Neuroimmunology*, [s.l.], v. 274, n. 1-2, p.1-13, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>.

GORMAN, Adrienne M.. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 12, n. 6, p.2263-2280, 10 jul. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x>.

GLICK, Danielle; BARTH, Sandra; MACLEOD, Kay F.. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal Of Pathology*, [s.l.], v. 221, n. 1, p.3-12, 3 fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2697>.

GUO, De-jian et al. Neuroprotective effects of luteolin against apoptosis induced by 6-hydroxydopamine on rat pheochromocytoma PC12 cells. *Pharmaceutical Biology*, [s.l.], v. 51, n. 2, p.190-196, 5 out. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2012.716852>.

GUSTAVSSON, Anders et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, [s.l.], v. 21, n. 10, p.718-779, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.008>.

HALLIWELL, Barry. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*, [s.l.], v. 18, n. 9, p.685-716, 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>.

HARTUNG, Thomas. Food for Thought ... on Cell Culture. *Altex*, [s.l.], v. 1, n. 24, p.143-152, jul. 2007.

HEIM, Kelly E.; TAGLIAFERRO, Anthony R.; BOBILYA, Dennis J.. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Of Nutritional Biochemistry*, [s. L.], v. 0, n. 13, p.572-584, abr. 2002.

HODEK, Petr; TREFIL, Pavel; STIBOROVÁ, Marie. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological Interactions*, [s.l.], v. 139, n. 1, p.1-21, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2797\(01\)00285-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00285-x).

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M.. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, [s.l.], v. 3, n. 77, p.1-17, 6 abr. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>.

HOSSEINI, Azar; SADEGHNIA, Hamid Reza; RAJABIAN, Arezoo. Protective effects of peel and seed extracts of *Citrus aurantium* on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell line. *Folia Neuropathologica*, [s.l.], v. 3, p.265-272, 2016. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2016.62536>.

HU, Shuang et al. Mitochondria Related Pathway Is Essential for Polysaccharides Purified from *Sparassis crispa* Mediated Neuro-Protection against Glutamate-Induced Toxicity in Differentiated PC12 Cells. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 2, p.133-145, 26 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17020133>.

KATSNELSON, A.; STROOPER, B. de; ZOGHBI, H. Y.. Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications. *Science Translational Medicine*, [s.l.], v. 18, n. 364, p.1-5, 9 nov. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aal2074>.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine*, v. 1, n. 1, 2016.

KIRALY, Gabor et al. Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions. *Apoptosis*, v. 22, n. 2, p. 207-219, 2017.

KINET, Maxime J. et al. HSF-1 activates the ubiquitin proteasome system to promote non-apoptotic developmental cell death in *C. elegans*. *Elife*, v. 5, p. e12821, 2016.

KOENIGSKNECHT-TALBOO, J. et al. Rapid Microglial Response Around Amyloid Pathology after Systemic Anti-A Antibody Administration in PDAPP Mice. *Journal Of Neuroscience*, [s.l.], v. 28, n. 52, p.14156-14164, 24 dez. 2008. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4147-08.2008>.

KOGO, JIRO et al. Involvement of TNF- α in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain research*. p201-208. 2006

KOZIOWSKA, Aleksandra; SZOSTAK-WęGIEREK, Dorota. FLAVONOIDS - FOOD SOURCES AND HEALTH BENEFITS. *Arch Toxicol*, [s. L.], v. 2, n. 65, p.79-85, mar. 2014.

KRASIEVA, B. TATIANA et al. Cell and brain tissue imaging of the flavonoid fisetin using label-free two-photon microscopy. *Neurochemistry International*. p1-6. 2015

LEE, JONG-HUN et al. (–)-Epigallocatechin gallate attenuates glutamate-induced cytotoxicity via intracellular Ca²⁺ modulation in PC12 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 31, p. 530-536. 2004.

LEONG, K.g.; KARSAN, A.. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor
a. *Histology And Histopathology*, [s.l.], v. 1, n. 15, p.1303-1325, 2000.

LEYVA-LÓPEZ, Nayely et al. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible
Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International Journal Of Molecular
Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 6, p.921-936, 9 jun. 2016. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060921>.

LEVITES, Yona et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents
N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic
neurodegeneration. *Journal Of Neurochemistry*, [s.l.], v. 78, n. 5, p.1073-1082, 20
dez. 2001. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00490.x>.

LI, An-na et al. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols.
Nutrients, [s.l.], v. 6, n. 12, p.6020-6047, 22 dez. 2014. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/nu6126020>.

LILL, Christina M. et al. The role of TREM2 R47H as a risk factor for Alzheimer's
disease, frontotemporal lobar degeneration, amyotrophic lateral sclerosis, and
Parkinson's disease. *Alzheimer's & Dementia*, [s.l.], v. 11, n. 12, p.1407-1416, dez.
2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.12.009>.

Lin, Shan-Shan et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived
Microvesicles Protect Rat Pheochromocytoma PC12 Cells from Glutamate-
Induced Injury via a PI3K/Akt Dependent Pathway. *Neurochem Res*, [s.l.], v 39, p
922-931, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-014-1288-0>.

Liu YM et al. *Chinese Herbal Medicines*, 2015, 7(3): 238-246

Liu, E.Y.L, et al. Genistein, a Phytoestrogen in Soybean, Induces the Expression
of Acetylcholinesterase via G Protein-Coupled Receptor 30 in PC12 Cells. *Front.
Mol. Neurosci.* v11. p1-11. (2018). doi: 10.3389/fnmol.2018.00059

LIU, Qian et al. The potential neurotoxicity of emerging tetrabromobisphenol A
derivatives based on rat pheochromocytoma cells. *Chemosphere*, [s.l.], v. 154,

p.194-203, jul. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.117>.

MARTIN, Dale D.o. et al. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends In Neurosciences*, [s.l.], v. 38, n. 1, p.26-35, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.09.003>.

MARTIN, Lee J.; WONG, Margaret. Enforced DNA repair enzymes rescue neurons from apoptosis induced by target deprivation and axotomy in mouse models of neurodegeneration. *Mechanisms Of Ageing And Development*, [s.l.], v. 161, p.149-162, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2016.06.011>.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W.. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1-29, 1 abr. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MENDONÇA, Leonardo Meneghin et al. Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells. *Neurotoxicology*, [s.l.], v. 34, p.205-211, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.011>.

MORALES, Gabriela Huelgas; GREENSTEIN, David. C. elegans germline cell death, live!. *PLoS genetics*, v. 14, n. 7, p. e1007425, 2018.

MOSSMAN, T.; *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55

NAM, Yoon Jeong et al. Flavanonol Taxifolin Attenuates Proteasome Inhibition-Induced Apoptosis in Differentiated PC12 Cells by Suppressing Cell Death Process. *Neurochemical Research*, [s.l.], v. 40, n. 3, p.480-491, 5 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-014-1493-x>.

NORDEN, Diana M.; MUCCIGROSSO, Megan M.; GODBOUT, Jonathan P.. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, [s.l.], v. 96, p.29-41, set. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.028>.

OMS,2017.https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5560:demencia-numero-de-pessoas-afetadas-triplicara-nos-proximos-30-anos&Itemid=839. 17 dez 2017. Acessado em: 21 fev 2019

ONO, Kenjiro et al. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal Of Neurochemistry*, [s.l.], v. 87, n. 1, p.172-181, 12 set. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01976.x>.

PARASURAMAN, Subramani; DAVID, Alexandervictor Anand; ARULMOLI, Radhakrishnan. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, [s.l.], v. 10, n. 20, p.84-89, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.194044>.

PHATNANI, Hemali; MANIATIS, Tom. Astrocytes in Neurodegenerative Disease: Table 1.. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1-18, 15 abr. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>.

PERRY, V. Hugh; HOLMES, Clive. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, [s.l.], v. 10, n. 4, p.217-224, 18 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>.

POEWE, Werner et al. Parkinson disease. *Nature reviews Disease primers*, v. 3, p. 17013, 2017.

PRINCE, Martin J et al. The burden of disease in older people and implications for health policy and practice. *The Lancet*, [s.l.], v. 385, n. 9967, p.549-562, fev. 2015.

PRZEDBORSKI, Serge; VILA, Miquel; JACKSON-LEWIS, Vernice. Series Introduction: Neurodegeneration. *Journal Of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 111, n. 1, p.3-10, 1 jan. 2003. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200317522>.

RUZO, Albert et al. Chromosomal instability during neurogenesis in Huntington's disease. *Development*, v. 145, n. 2, p. dev156844, 2018.

SELKOE, Dennis J.; HARDY, John. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.

SHAO, Lifei et al. The Contribution of Necroptosis in Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, [s.l.], p.1-10, 5 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-017-2249-1>.

SHARMA, Kk et al. Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4R's. *Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 73, n. 1, p.1-6, 2011. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474x.89750>.

SCHELMAN, William R. et al. Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Molecular Brain Research*, [s.l.], v. 128, n. 2, p.160-169, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.06.011>.

SILBERBERG, Donald et al. Brain and other nervous system disorders across the lifespan — global challenges and opportunities. *Nature*, [s.l.], v. 527, n. 7578, p.151-154, 18 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16028>.

SINGH, Ravindra Pratap; SHARAD, Shashwat; KAPUR, Suman. Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Indian Academy Of Clinical Medicine*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.218-225, set. 2004.

SOLANKI, Isha; PARIHAR, Priyanka; PARIHAR, Mordhwaj Singh. Neurodegenerative diseases: From available treatments to prospective herbal therapy. *Neurochemistry International*, [s.l.], v. 95, p.100-108, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.11.001>.

SON, Jin H. et al. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 44, n. 2, p.89-98, fev. 2012.

SONG, Qing; GOU, Wen-li; ZOU, Yu-liang. FAM3A Protects Against Glutamate-Induced Toxicity by Preserving Calcium Homeostasis in Differentiated PC12 Cells. *Cellular Physiology And Biochemistry*, [s.l.], v. 44, n. 5, p.2029-2041, 2017. Cell Physiol Biochem Press GmbH and Co KG. <http://dx.doi.org/10.1159/000485943>.

SOOB RATTEE, M.a. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, [s.l.], v. 579, n. 1-2, p.200-213, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>.

STEFANATOS, Rhoda; SANZ, Alberto. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS letters*, v. 592, n. 5, p. 743-758, 2018.

STERNECKERT, Jared L.; REINHARDT, Peter; SCHÖLER, Hans R.. Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, [s.l.], v. 15, n. 9, p.625-639, 29 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3764>.

SURMEIER, D. James; OBESO, José A.; HALLIDAY, Glenda M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature reviews Neuroscience*, v. 18, n. 2, p. 101, 2017.

SWEENEY, Patrick et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1-3, 13 mar. 2017.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, v. 53, n. 2, p. 1181-1194, 2016.

TIAN, Huan et al. Effects of phenolic constituents of daylily flowers on corticosterone- and glutamate-treated PC12 cells. *Bmc Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-12, 21 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1582-x>.

TROULINAKI, Kostoula; TAVERNARAKIS, Nektarios. Necrotic cell death and neurodegeneration. *Worm*, [s.l.], v. 1, n. 3, p.176-181, jul. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/worm.20457>.

UTTARA, Bayani et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.65-74, 1 mar. 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157015909787602823>.

VARFOLOMEEV, Eugene; VUCIC, Domagoj. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*, [s.l.], v. 101, p.26-32, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>.

VERKHRATSKY, Alexei et al. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, [s.l.], v. 42, n. 5, p.1291-1301, 1 out. 2014. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20140107>.

Wang, Che-Jing. "Protective effect of selaginellin on glutamate-induced cytotoxicity and apoptosis in differentiated PC12 cells" *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, vol. 381, 2010, p73-81

WHO. *NEUROLOGICAL DISORDERS public health challenges*. Geneva: Who Press, 2006. 232 p.

XIAN, Yan-fang et al. Comparison the neuroprotective effect of Cortex *Phellodendri chinensis* and Cortex *Phellodendri amurensis* against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Phytomedicine*, [s.l.], v. 20, n. 2, p.187-193, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.028>.

Yaginuma, H., et al. 1996. A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* 16:3685–3703.

YANS, Asal et al. Digitoflavone provokes mitochondrial biogenesis in PC12 cells: A protective approach to oxidative stress. *Pharmaceutical Biology*, [s.l.], v. 53, n. 12, p.1727-1734, 5 maio 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1005749>.

YE, Ling et al. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal Of Neurochemistry*, [s.l.], v. 125, n. 6, p.897-908, 3 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12263>.

ZHANG, JING et al. Neuroprotective Effects of Theaflavins Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Neurochem Res.* p.1-9. 2016.

ZHANG, BO; LI, WEN; DONG, MINGSHENG. Flavonoids of Kudzu Root Fermented by *Eurotium cristatum* Protected Rat Pheochromocytoma Line 12 (PC12) Cells against H₂O₂-Induced Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* v.18. p2-15. 2017

ZHENG, W et al. Artemisinin conferred ERK mediated neuroprotection to PC12 cells and cortical neurons exposed to sodium nitroprusside-induced oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine.* v97. p58–167. 2016

ZHOU, Yu-zhi et al. Protective effect of isoliquiritin against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food & Function*, [s.l.], v. 8, n. 3, p.1235-1244, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6fo01503d>.