



**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde**



**PMBqBM
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular**

Rafael Short Ferreira

**EFEITO NEUROPROTETOR DO FLAVONOIDE
RUTINA EM MODELOS DE EXCITOTOXICIDADE
INDUZIDA POR GLUTAMATO**

**Salvador
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



RAFAEL SHORT FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Salvador

2016

Ficha catalográfica fornecida pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

F383 Ferreira, Rafael Short

Efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em modelos de excitotoxicidade induzida por glutamato. / Rafael Short Ferreira. -- Salvador/BA, 2016.

68 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva.
Coorientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular) -- Universidade Federal da Bahia, Departamento de Biofunção, 2016.

1. Glutamato. 2. Excitotoxicidade. 3. Rutina. 4. Neuroproteção. I. Silva, Victor Diogenes Amaral da. II. Moreira, José Cláudio Fonseca. III. Título.

CDU 577.1

RAFAEL SHORT FERREIRA

EFEITO NEUROPROTETOR DO FLAVONOIDE RUTINA EM MODELOS DE
EXCITOTOXICIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO

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

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva_____

Prof^a. Dr^a. Christianne Gazzana Salbego_____

Prof^a. Dr^a. Mariana Borges Botura_____

AGRADECIMENTOS

Venho aqui agradecer imensamente a todos aqueles que me fizeram aprender, crescer e me tornar um homem e um profissional melhor.

Primeiramente sou eternamente grato a Deus. Sou grato por todas as pessoas que Ele pôs no meu caminho, todas as experiências e por todos os momentos únicos vividos. A caminhada até aqui não foi fácil, porém com ela pude enxergar e aprender que tudo tem seu lado positivo e sua razão de acontecer, e que quem O tem no coração, já está completo!

Obrigado a minha família, que é meu alicerce, minha inspiração e minha grande motivadora para desbravar novos caminhos. O apoio e a torcida de vocês foram muito importantes nessa empreitada que enfrentei. Em especial gostaria de agradecer a minha mãe, essa mulher guerreira, cheia de amor e bondade no coração que sempre me estimulou a estudar. A meu pai, por todos os ensinamentos diretos e indiretos, pelo estímulo aos estudos e pela receptividade cheia de alegria e de energia positiva. A meu irmão Maurício, um cara que consegue expressar toda a sua felicidade, amor, inspiração e luta com gestos e olhares, que palavras não conseguem descrever. Você me mostrou que vale a pena lutar quando queremos muito um objetivo! A minha irmã Jéssica, que apesar de ser a mais nova, demonstra muita maturidade e segurança, nos passando muito amor e aprendizado. Amo todos vocês!!

Agradeço a todos os meus amigos, pela compreensão em muitos momentos que precisei me ausentar para me dedicar ao mestrado, pelos momentos de descontração e por me incentivarem a fazer o mestrado do início ao fim.

Agradeço imensamente a meu orientador Victor, um cara com um coração do tamanho do mundo e iluminado por Deus, que nos passa muita sabedoria, tranquilidade e inspiração para buscar nossos objetivos. Seu direcionamento foi indispensável neste processo! Valeu, meu “irmão mais velho”!

Sou grato também à professora Silvia, por ter me acolhido no laboratório com todo carinho e ter me passado ensinamentos que ultrapassam a barreira acadêmica! Você atuou como uma “enzima” no meu processo de conhecimento!

Obrigado aos professores Fátima e Ramon. Tenho vocês como grandes mestres, dotados de características as quais vou lutar para alcançar.

Keu, muitíssimo obrigado! A sua paz, seu carinho, sua inteligência e sua visão além dos limites me ajudaram a compreender muitas dificuldades que enfrentei ao começar esta empreitada!

Agradeço a professora Luzimar e a toda equipe de professores do PMBqBM por tudo! Hoje vejo que toda a cobrança tinha um propósito maior, um propósito para o nosso crescimento. Sou grato por todo conhecimento e pelas resenhas fora da sala de aulas!

Agradeço a todos os amigos do laboratório, que direta ou indiretamente me somaram. Sem vocês, o desenvolvimento deste trabalho não seria possível. Em especial, gostaria de agradecer a Lipe, a Érica Patrícia e a Livinha. Desde o começo desta empreitada vocês estiveram do meu lado. A energia positiva, a amizade e o conhecimento que me passaram são de grande valia! O mesmo vale para Vanessinha e para Ju, onde a disposição e o companheirismo estiveram presentes a todo o momento! Neste grupo tem muitas pessoas que gostaria de citar, mas aí acho que vou precisar de mais uma dissertação para incluir todos nela (rsrs)! Todos vocês são incríveis!

Agradeço aos amigos que o PMBqBM me proporcionou. Passamos juntos por momentos puxados e por momentos de ótimas lembranças! Vocês são demais!

Agradeço também ao professor Luiz Henrique. Sua experiência, calma e energia foram indispensáveis no processo do meu desenvolvimento humano. Suas observações foram determinantes na minha evolução como profissional e como pessoa!

Minha família aumentou ao conhecer todos vocês! Obrigado, pessoal!!!

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

(John Ruskin)

FERREIRA, Rafael Short. Efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em modelos de excitotoxicidade induzida por glutamato. 68fl. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

Rutina é um flavonoide glicosilado que apresenta diversas atividades biológicas incluindo anti-inflamatória, antitumoral e efeitos farmacológicos promissores no sistema nervoso central (SNC). A morte neuronal induzida por excitotoxicidade glutamatérgica está presente em diversas doenças e envolve diversas alterações celulares, incluindo danos mitocondriais. Para prevenir a excitotoxicidade, o glutamato é removido pelos astrócitos e convertido em L-glutamina, através da ação da glutamina sintetase (GS). O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos neuroprotetores da rutina com vistas na proteção mitocondrial e modulação de proteínas envolvidas na detoxificação do excedente de glutamato pelos astrócitos.. Estudos de efeitos neuroprotetores foram realizados em dois modelos de estudo do SNC: culturas organotípicas de cérebro de ratos Wistar neonatos (P8) expostas ao glutamato (60 mM) por 24 h, concomitantemente a tratamento com rutina (0.5 – 1 μ M) e culturas primárias mistas de células isoladas do cerebelo de ratos Wistar (P8) expostas ao glutamato (10 mM) por 24 h e iniciado 4 h antes do tratamento com rutina (0,5 μ M). A viabilidade celular e os níveis de expressão de GS, de GLAST e de GLT1 em cultura organotípica cortical foram avaliados por captação de Iodeto de Propídio (IP) e *Western blotting*, respectivamente. A viabilidade neuronal em culturas primárias de cerebelo foi avaliada por coloração com Fluoro-Jade B. Além disso, a proteção mitocondrial pela rutina foi avaliada através do potencial de membrana e análise de produção ERO, usando safranina O e Amplex Red como sondas, respectivamente, em mitocôndrias isoladas a partir do encéfalo de ratos Wistar adultos expostas à rotenona. Na cultura organotípica, os nossos resultados mostraram que o glutamato (60 mM) induziu o aumento da intensidade de fluorescência relativa ao IP incorporado, que foram reduzidos em tratamentos com 0,5 μ M e 1 μ M de rutina. Ainda, foi demonstrado que rutina induziu aumento na expressão de GS e GLAST em tratamentos concomitantes com glutamato. Em culturas primárias de cerebelo, os nossos resultados mostraram que o glutamato (10 mM) induziu o aumento no número de células Fluoro-Jade B positivas, que não foi reduzido por pós-tratamento com rutina (0,5 μ M). Em mitocôndrias isoladas observamos que a rutina (10 μ M) reduziu a dissipação do potencial de membrana e reduziu a produção de ERO. Conclui-se que a rutina é um agente neuroprotetor com potencial para prevenir a excitotoxicidade induzida por glutamato e sugere-se que esse efeito envolve proteção mitocondrial e regulação do metabolismo do glutamato por astrócitos. No entanto, mais estudos são cruciais, a fim de elucidar o mecanismo molecular de neuroproteção induzida por rutina contra danos causados por glutamato e compreender o papel das células gliais, especialmente astrócitos na bioatividade de rutina.

Palavras-chave: glutamato, excitotoxicidade, rutina; neuroproteção

FERREIRA, Rafael Short. Neuroprotective effect of flavonoid rutin in models of excitotoxicity induced by glutamate. 68fl. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Rutin is a glycosylate flavonoid that has various biological activities, including anti-inflammatory action, antioxidant, antitumoral and promising pharmacological effects on CNS. Neuronal death induced by glutamate excitotoxicity is present in several diseases and involves various cellular dysfunctions, including mitochondrial damage. glutamine through the action of glutamine synthetase (GS). The aim of this study was to evaluate the neuroprotective effects of rutin with a focus on mitochondrial protection and modulation of proteins associated with glutamate excess detoxification by astrocytes. Studies of neuroprotective effects were performed in two CNS study model: brain organotypic culture from newborn (P8) Wistar rats exposed to glutamate (60 mM) for 24h, concomitantly to rutin treatment (0.5 – 1 μ M), and mixed primary culture of cells isolated from the cerebellum of P8 Wistar rats exposed to glutamate (10 mM) for 24h and started 4h before rutin treatment (0.5 μ M). Cell viability and GS expression levels in brain organotypic culture were assessed by Propidium Iodide (PI) uptake and Western blot, respectively. Neuronal viability changes in cerebellar primary cultures were assessed by Fluoro-Jade B staining. Moreover, mitochondrial protection by rutin was evaluated by membrane potential and ROS production analysis, using safranin O and amplex red as probe, respectively in isolated mitochondria from cortex of Wistar adult rats exposed to rotenone. In organotypic culture, our results demonstrated that glutamate (60mM) induced increase of fluorescence intensity on the IP uptake, that was reduced by 0.5 μ M and 1 μ M rutin treatment. Furthermore, It was demonstrated that rutin – glutamate concomitant treatment induced increase of GS and GLAST expression. In cerebellar primary cultures, our results demonstrated that glutamate (10mM) induced increase in the number of Fluoro-Jade B positive cells, that was not reduced by rutin (0.5 μ M) post-treatment. In addition, on isolated mitochondria, we observed that rutin (10 μ M) reduced membrane potential dissipation and reduced ROS production. We conclude that rutin is a neuroprotective agent to prevent excitotoxicity and suggested that this protective effect involves mitochondrial protection and astrocytic metabolism of glutamate. However, more studies are crucial in order to elucidate the molecular mechanism of neuroprotection induced by rutin against damage induced by glutamate and understand the role of glial cells, especially astrocytes on bioactivity of rutin.

Keywords: Glutamate, excitotoxicity, rutin; neuroprotection

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do flavonoide rutina	26
FIGURA 2: Desenhos experimentais	32
FIGURA 3: Análise de viabilidade celular através da incorporação do Iodeto de Propídio (IP) em culturas organotípicas de cérebro	40
FIGURA 4: Ensaio de modulação da expressão de glutamina sintetase (GS) por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do <i>Western Blotting</i>	41
FIGURA 5: Ensaio de modulação da expressão das proteínas transportadoras GLAST e GLT1 por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do <i>Western Blotting</i>	43
FIGURA 6. Análise dos níveis de mRNA das proteínas transportadoras GLAST e GLT1 por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do RTq-PCR.....	44
FIGURA 7: Avaliação da função de mitocôndrias isoladas de encéfalo de ratos machos Wistar adultos incubadas com rotenona	46
FIGURA 8: Análise da degeneração neuronal através da coloração com Fluoro-Jade B e marcação de núcleos com DAPI em culturas primárias de cerebelo	47

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Gás carbônico
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	4,6diamidino-2-phenilindol
DH	Doença de Huntington
DMEM/HAM F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EAAT	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FJB	Fluoro-Jade B
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína acídica fibrila glial
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
GLU	Glutamato
GS	Proteína Glutamina Sintetase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPRT1	Hipoxantina Fostoribosiltransferase 1
iGluRs	Receptor ionotrópico de Glutamato
IP	Iodeto de Propídio
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
KA	Cainato
KCl	Cloreto de Potássio
LDH	Desidrogenase láctica
mGluRs	Receptor metabotrópico de Glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
ONOO-	Peroxinitrito
pH	Potencial de Hidrogênio

PBS	Tampão Salino Fosfato
PFA 4%	Paraformaldeído a 4%
PVDF	Fluoreto de polivinilidene
qRT-PCR	Reação de Polimerização em Cadeia quantitativa em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucléico
RUT	Rutina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNPC	Substância Nigra Pars Compacta
STN	Núcleo subtalâmico
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
UDA	Unidade Densitométrica Arbitrária Relativa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRINCIPAIS COMPONENTES CELULARES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ENVOLVIDOS NA CITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....	14
2.2 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....	16
2.2.1 Neurônios, protagonistas da excitotoxicidade glutamatérgica	17
2.2.2 Astrócitos, principais coadjuvantes da excitotoxicidade glutamatérgica	19
2.2.3 Excitotoxicidade pelo glutamato nas diversas patologias do Sistema Nervoso Central	20
2.3 FLAVONOIDES.....	24
2.3.1 Efeitos neuroprotetores de flavonoides	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 MODELOS DE ESTUDO	28
4.1.1 Culturas organotípicas de cérebro.....	28
4.1.2 Culturas primárias mistas de células do cerebelo.....	29
4.2 EXPOSIÇÃO ÀS DROGAS.....	30
4.2.1 Tratamento com o flavonoide rutina	30
4.2.2 Tratamento com o glutamato.....	30
4.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO.....	33
4.3.1 Teste de incorporação do Iodeto de Propídio (IP)	33
4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA	33
4.4.1 Análise da expressão de Glutamina Sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos excitatórios GLAST e GLT1 por <i>Western Blotting</i>	33
4.4.2 Extração de RNA e qRT-PCR	34
4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL	35
4.5.1 Isolamento e tratamentos das mitocôndrias.....	35
4.5.2 Análise do potencial de membrana mitocondrial	36
4.5.3 Análise produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	36

4.6 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CEREBELO	37
4.6.1 Análise da degeneração neuronal por Fluoro-Jade B (FJB)	37
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5. RESULTADOS	39
5.1 RUTINA REDUZ INCORPORAÇÃO DE IP EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO	39
5.2 RUTINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GS EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO	39
5.3 RUTINA MODULA A EXPRESSÃO DE GLAST E DE GLT1 EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO	42
5.4 RUTINA MODULA NÍVEIS DE mRNA DE GLAST EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO	44
5.5 RUTINA APRESENTA EFEITO PROTETOR EM MITOCONDRIAS ISOLADAS DE CEREBRO DE RATOS	45
5.6 PÓS-TRATAMENTO COM RUTINA NÃO REDUZ A MORTE NEURONAL EM CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CEREBELO	45
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A excitotoxicidade glutamatérgica é um evento que pode desencadear a morte neuronal no SNC de mamíferos e está presente em diversas doenças neurodegenerativas de caráter progressivo lento, como a Doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) (Caudle e Zhang, 2009; Campos-Peña e Meraz-Ríos, 2014) ou de caráter súbito, como acidente vascular cerebral (Rothman, 1984). A elevada concentração do neurotransmissor glutamato leva a ativação dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos, o que proporciona o aumento da concentração de cálcio intracelular levando a ativação de proteases e fatores pró-apoptóticos, produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial resultando em neurodegeneração (Martin, 2010; Kritis *et al.*, 2015; Amani *et al.*, 2016)

A busca por fármacos que proporcionem a homeostase fisiológica e protejam ou regulem as cascatas de sinalização intracelular de morte neuronal é importante. Neste sentido, compostos derivados de vegetais como alcaloides e flavonoides têm se mostrado eficientes na manutenção da sobrevivência celular em cultura de células gliais e neuronais. Os flavonoides em particular apresentam um grande efeito neuroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante (Middleton e Kandaswami, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1997). Flavonoides são substâncias que apresentam compostos polifenólicos complexos, sendo dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, os quais fazem parte de uma família com mais de 4.000 diferentes substâncias listadas até a presente data. Eles são classificados em flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis, grupos estes os quais se diferenciam um do outro pela variação do número e posição do grupamento hidroxila, por modificações nos núcleos e pelo grau de metilação e glicosilação (Harborne e Williams, 2000).

A rutina é um flavonoide que se destaca pela ação biológica devido à sua glicosilação e está classificada dentro do subgrupo flavonol. Este flavonoide tem demonstrado, não só ação antioxidante e anti-inflamatória, como descrito na literatura para outros flavonoides do mesmo grupo, como também ação direta em células do sistema nervoso central, com efeitos farmacológicos promissores (Hodek *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008; Krizkova *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011).

Tendo em vista a grande variedade de compostos naturais com potencial efeito benéfico à saúde humana, torna-se plausível a bioprospecção de moléculas biologicamente ativas com potencial neuroprotetor, que estejam presentes na alimentação humana. Neste sentido, no atual trabalho buscamos avaliar o efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em modelos *in vitro* de excitotoxicidade glutamatérgica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRINCIPAIS COMPONENTES CELULARES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ENVOLVIDOS NA CITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

O sistema nervoso central (SNC) é formado por células altamente específicas, com muitas funções definidas. A protagonista delas é o neurônio, célula dotada de axônio, responsável pela emissão de sinais e de diversos dendritos, responsáveis pela captação de sinais entre os neurônios (Araque e Navarrete, 2010; Stiles e Jernigan, 2010). O SNC também é constituído por um conjunto de células denominado células gliais ou neuroglia. Este grupo é subdividido em vários subgrupos celulares e são de enorme importância na nutrição, homeostase e proteção neuronal, tanto no estado fisiológico quanto patológico (Fields e Stevens-Graham, 2002; Herculano-Houzel e Lent, 2005).

De acordo com Herculano-Houzel e Lent, (2005), o cérebro de um rato adulto contém aproximadamente 200 milhões de neurônios em um universo com cerca de 330 milhões de células, onde 70% destes neurônios estão localizados no cerebelo. Estes dados mostram, ao contrário do que normalmente era assumido na literatura, que nesses animais, as células gliais não são maioria quando comparadas aos neurônios. Já em estudos com o cérebro de um adulto humano do sexo masculino, pode-se observar que este apresenta em torno de 170 bilhões de células, sendo 86 bilhões de neurônios e 84 bilhões de células gliais. Nesta espécie, os neurônios se distribuem nas diferentes estruturas do SNC de forma similar aos dados observados em ratos, com cerca de 80% localizados no cerebelo e cerca de 19% no córtex, apesar desta estrutura apresentar maior massa (Azevedo *et al.*, 2009).

As células gliais têm, dentre as suas principais funções, o papel de proporcionar aos neurônios um suporte nutricional, imunológico e protetor, com objetivo da manutenção da homeostasia durante o estado fisiológico. Elas dispõem-se circundando o corpo celular, axônio e dendritos dos neurônios para interagir extensivamente, influenciando suas atividades (Fields e Stevens-Graham, 2002; Herculano-Houzel e Lent, 2005). Neste grupo, há quatro tipos de células que se destacam: NG2, oligodendrócitos, microglias e astrócitos.

As células NG2, assim chamadas devido à expressão comum do proteoglicano NG2, caracterizam-se por serem progenitoras de oligodendrócitos (Hall *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 1997; Nishiyama *et al.*, 1999). Porém, sabe-se atualmente que elas podem ser capazes de gerar astrócitos protoplasmáticos, e há estudos que demonstram a sua relação com a formação também de neurônios (Aguirre e Gallo, 2004; Zhu *et al.*, 2011).

Outro importante grupo de células gliais são os oligodendrócitos, os quais se destacam pela mielinização de axônios. Este processo interfere diretamente na velocidade do sistema de transmissão neuronal de sinais, daí vem a sua importância. No entanto, os oligodendrócitos são vulneráveis ao estresse oxidativo, excitotoxicidade pelo glutamato e às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Sendo assim, todos esses fatores são contribuintes para a perda de oligodendrócitos, como é visualizado na isquemia cerebral (Bradl e Lassmann, 2010).

A microglia destaca-se por ser um conjunto de células consideradas imunoefetoras, as quais se caracterizam por ser o primeiro grupo celular a responderem ações de patógenos invasores. Ela apresenta no SNC papéis semelhantes aos macrófagos: fagocitose, apresentação de antígeno e indução à inflamação (Kandel, 2000; Aloisi, 2001).

Já os astrócitos são as células gliais mais presentes no SNC. Eles têm múltiplas funções: fornecimento de metabólitos para o neurônio, atuação como marcador patológico através da astrogliose reativa e na defesa contra o estresse oxidativo, e na fenda sináptica é responsável pela homeostase iônica e do pH, além da cooperação no tráfego e reciclagem de neurotransmissores, dentre outras funções. No metabolismo do glutamato, os astrócitos contêm uma importante enzima, a glutamina sintetase (GS), participando com isto como peça chave na

prevenção contra a excitotoxicidade glutamatérgica (Belanger e Magistretti, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010; Dringen *et al.*, 2015)

2.2 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

A excitotoxicidade é definida como a morte celular causada pela toxicidade de aminoácidos excitatórios. Por ser o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, o glutamato pode atuar como indutor de dano e morte neuronal, quando exposto em altas concentrações aos neurônios por um tempo prolongado, o que leva a uma incontrolada despolarização contínua, processo este tóxico. Essa condição gera reações em cascatas de sinalização intracelular que podem ativar o mecanismo de morte celular através de diversas vias: geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, influxo excessivo de cálcio, ativação de enzimas catabólicas e disfunção mitocondrial, sendo todas essas alterações correlacionadas entre si (Berliocchi *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2009; Kritis *et al.*, 2015; Amani *et al.*, 2016).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são radicais livres resultantes do metabolismo do oxigênio que podem ser produzidos em grandes concentrações em algumas doenças do SNC, por distintas vias. Quando há falhas no sistema de proteção antioxidante, a célula fica incapaz de se defender e então ocorre o estresse oxidativo, fator significativo em patogêneses de lesão neuronal. Eles são capazes de danificar ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e permeabilizar mitocôndrias, interferindo no seu metabolismo e viabilidade celular (Porta *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2009).

A excitotoxicidade pelo glutamato é um processo dependente do influxo de cálcio através dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos. O influxo de cálcio é capaz de ativar cascatas de sinalização e gerar morte celular. Porém, o tipo de morte celular é dependente da extensão e do tempo desse influxo. Caso este influxo seja lento, os neurônios podem vir a entrar num processo de apoptose. Já se houver uma rápida entrada de cálcio para o espaço intracelular, os neurônios sofrem lise necrótica (Olney, 1969; Berliocchi *et al.*, 2005). A morte neuronal mediada pelo influxo de cálcio pode se dar por alterações do pH intracelular devido à desregulação da bomba de sódio/potássio/cálcio, por ativação da proteases, como a calpaína, ou

por influência em organelas sensíveis a esse íon, como o retículo endoplasmático ou mitocôndria (Dong *et al.*, 2009).

Outro fator que pode interferir na excitotoxicidade pelo glutamato é a integridade da mitocôndria. Além do seu papel de produção de energia, as mitocôndrias atuam como importantes mediadoras da viabilidade celular. Logo, alterações nas funções fisiológicas do compartimento citosólico, como a alta concentração de cálcio ou o estresse oxidativo em excesso estimulada por fatores patogênicos ou inflamatórios induz a permeabilidade mitocondrial. Este quadro quebra o equilíbrio eletroquímico mitocondrial e pode ativar a liberação de mais cálcio para o citosol, visto que a mitocôndria é capaz de armazenar uma grande quantidade de cálcio, potencializando o processo de morte celular. Ela também pode ativar a liberação de fatores pró-apoptóticos, a exemplo da liberação do citocromo C e consequente ativação de caspase 3 e 9 (White e Reynolds, 1996; Schulz *et al.*, 1997; White e Reynolds, 1997b; a; Li e Beal, 2005; Gogvadze e Orrenius, 2006; Ju *et al.*, 2009). Todo esse processo gera um ciclo de produção de fatores desfavoráveis para a viabilidade celular, a exemplo da maior produção de espécies reativas de oxigênio, que potencializam a ação da ativação de vias de morte celular (Schulz *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2009).

2.2.1 Neurônios, protagonistas da excitotoxicidade glutamatérgica

Os neurônios são células responsáveis pelo processamento de informações por meio de conexões com outros neurônios formando redes de comunicação através de sinapses (respostas elétricas e químicas). Eles variam em tamanho, conformação e função e são os principais componentes celulares do cérebro e do SNC (Araque e Navarrete, 2010; Stiles e Jernigan, 2010). Dentre as funções baseadas nas conexões, os neurônios podem ser classificados em três tipos: sensitivo, motor e interneurônio. Os neurônios sensitivos (aférentes) fazem parte do sistema nervoso periférico e são responsáveis por transmitir informações de tecidos e órgãos para o SNC. Os neurônios motores (eferentes) compreendem aqueles que proporcionam uma resposta ou estímulo a partir do SNC para os outros órgãos ou tecidos. Já os interneurônios (associativos) são aqueles que têm a capacidade de conectar neurônios a regiões específicas do SNC (Mcbain e Fisahn, 2001; Clark *et al.*, 2006).

Os neurônios também podem ser classificados conforme a produção/captação de seus principais neurotransmissores: dopaminérgicos, colinérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos (Hyman *et al.*, 1991). Neste sentido, neurônios glutamatérgicos são aqueles envolvidos no processo de atividade sináptica com o glutamato e são encontrados em maior quantidade principalmente no cerebelo, córtex cerebral e hipocampo (Molyneaux *et al.*, 2007).

O glutamato, neurotransmissor excitatório o qual nomeia essa subclasse de neurônios, é o aminoácido mais encontrado no cérebro de mamíferos (Prybylowski e Wenthold, 2004). Além da sua importância no processo de transmissão de sinais, este neurotransmissor é relevante para o SNC na fase de crescimento neuronal, orientação do axônio e no desenvolvimento e amadurecimento cerebral (Lai *et al.*, 2014).

Fisiologicamente, o glutamato participa do chamado ciclo glutamato-glutamina. Após ser incorporado às vesículas pré-sinápticas no axônio, este neurotransmissor é liberado na fenda sináptica onde pode seguir por distintas vias. Uma delas é a ligação com receptores essenciais nos dendritos pós-sinápticos, efetuando a transmissão de sinais pelo SNC. Em outra via, o glutamato é recaptado pelos transportadores astrocitários, em humanos chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) (Daikhin e Yudkoff, 2000; Schousboe *et al.*, 2014).

Para ocorrer a primeira via, há uma característica importante dos neurônios glutamatérgicos, estes são providos de receptores essenciais para a transmissão sináptica, onde se subdividem em dois grandes grupos: ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) (Pinheiro e Mulle, 2008; Zhang *et al.*, 2016).

Os iGluRs são denominados assim, pois em seu receptor proteico transmembranar é o próprio canal iônico, responsivo à ativação pelo glutamato. Essa característica confere a esse grupo uma rápida neurotransmissão, visto que interfere ativamente no estado eletroquímico da membrana pós-sináptica com a alteração do fluxo de íons. Além disto, os iGluRs também são divididos em três categorias: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA) (Pinheiro e Mulle, 2008).

Já os mGluRs são conhecidos por sua ação intracelular por meio da proteína G, a qual é responsável pela ativação de segundos mensageiros, o que confere a este grupo uma resposta neurotransmissora mais lenta quando comparada aos iGluRs (Pinheiro e Mulle, 2008). Esse mecanismo pode gerar reorganizações

moleculares e modificações na expressão gênica, sendo esta última um fator importante nos processos moleculares relacionados à memória e a plasticidade (Reith, 2000).

Diante desses fatores, a adequada regulação glutamatérgica é muito importante, visto que o aumento da sua concentração na fenda sináptica e o aumento da atividade de seus receptores pode acarretar em alterações significativas prejudiciais desde a sua rota de sinalização e até morte celular via excitotoxicidade (Prybylowski e Wenthold, 2004; Wang e Qin, 2010).

2.2.2 Astrócitos, principais coadjuvantes da excitotoxicidade glutamatérgica

Os astrócitos, assim denominados pela morfologia estrelada, constituem cerca da metade de toda a população glial e são fundamentais para a captação de nutrientes e de oxigênio do sangue para os neurônios, para a manutenção da homeostasia do SNC, compõem o arcabouço tecidual que fornece sustentação ao SNC, e participam ainda dos mecanismos de defesa imunitária do tecido nervoso e dos fenômenos de detoxificação cerebral (Tardy, 1991; (Tardy, 2002; Herculano-Houzel e Lent, 2005). Também, participam do processo fundamental de eliminação de espécies reativas de oxigênio (Dringen *et al.*, 2015). E através de moléculas receptoras nos pedículos das extremidades dos prolongamentos astrocitários, que rodeiam as sinapses centrais, os astrócitos igualmente detoxificam o excedente de neurotransmissores, tais como o glutamato, acumulados nas fendas sinápticas. Por estas células, tanto o ácido gama-aminobutírico (GABA), quanto o glutamato, são metabolizados à glutamina. Este aminoácido, por sua vez, pode ser disponibilizado para os neurônios e utilizado para reformulação de neurotransmissores (Cajal, 1995; Kirchoff *et al.*, 2001; Nakase e Naus, 2004).

O excedente de aminoácidos excitatórios, em especial do glutamato, é regulado através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), os quais realizam transporte ativo do glutamato com regulação através do gradiente eletroquímico, principalmente de sódio e potássio. Estes são subdivididos em EAAT1 (GLAST – Transportador de glutamato e aspartato em ratos compatível a isoforma humana EAAT1), EAAT2 (GLT-1 – Transportador de Glutamato em ratos compatível com a isoforma humana EAAT2), EAAT3 (EAAC1), EAAT4 e EAAT5 (Bar-Peled *et al.*, 1997; Divito e Underhill, 2014). O GLAST e o GLT-1 são

encontrados predominantemente em astrócitos e são os principais transportadores responsáveis pela regulação do excedente da concentração de glutamato associados às sinapses excitatórias. O EAAT3 é expresso em baixas concentrações por todas as regiões cerebrais. O EAAT4 e o EAAT5 são expressos em maior quantidade nas regiões do cerebelo e da retina, respectivamente (Kim *et al.*, 2011; Divito e Underhill, 2014). Nesse sentido, a importância desses transportadores, em especial o GLAST e o GLT-1, torna-se alta em situações patológicas envolvidas com o excesso de glutamato.

Os astrócitos também são células apresentadoras de antígeno, capazes de exteriorizar em suas membranas, antígenos e provocar uma ação defensiva do sistema imunitário contra agentes patogênicos (Siegel *et al.*, 1999).

A reatividade astrocitária, também conhecida como astrogliose, é caracterizada por hiperplasia e hipertrofia celular, com formação de processos citoplasmáticos e pelo aumento da expressão do sensível marcador estrutural denominado proteína ácida do gliofilamento (GFAP), que é uma proteína constituinte do filamento intermediário dos astrócitos (Cookson *et al.*, 1994; Cookson e Pentreath, 1994; Mead e Pentreath, 1998; Gomes *et al.*, 1999; Hughes, 2006), ou aumento na expressão do sensível marcador funcional, a Glutamina Sintetase (GS), que participa do processo metabólico de conversão de glutamato em glutamina (Condorelli *et al.*, 1990).

2.2.3 Excitotoxicidade pelo glutamato nas diversas patologias do SNC

A excitotoxicidade pelo glutamato é um fenômeno de perturbação fisiológica envolvida nos mecanismos patológicos de várias doenças no SNC, sejam elas desordens neurodegenerativas agudas ou crônicas (Dong *et al.*, 2009). Dentre elas, destacam-se desordens crônicas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, além de desordens agudas, tais como o acidente vascular cerebral, dentre outros (Griffith *et al.*, 2008; Liu e Murphy, 2009; Quintanilla *et al.*, 2016; Wang e Reddy, 2016).

A doença de Alzheimer (DA) é marcada por alteração neurodegenerativa no SNC associada à perda de memória progressiva e ao déficit cognitivo e está relacionada com mais frequência à senilidade. Ela é caracterizada pelo depósito extracelular do peptídeo beta-amilóide e pela formação de emaranhados

neurofibrilares (Ballard *et al.*, 2011). Este processo pode desencadear múltiplas vias de fatores neurotóxicos, incluindo a excitotoxicidade do glutamato por excesso de ativação do receptor NMDA (Griffith *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009).

Algumas vias fisiopatológicas têm sido sugeridas responsáveis pelo excedente de glutamato na DA. Inicialmente foi sugerido em um estudo realizado por Albin e Greenamyre, que mostrou a associação da perda de células neuronais glutamatérgicas, com danos direcionados aos corpos celulares e aos dendritos de regiões corticais (Albin e Greenamyre, 1992). Em seguida, uma nova hipótese de que a presença do peptídeo beta-amilóide estaria associada à inibição da captação do glutamato por esses transportadores (Harris *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1996), de forma que os transportadores que estariam bloqueados pelo peptídeo beta-amilóide (Campo-Peña e Meraz-Ríos, 2014). E por fim, a demonstração por Masliah, *et al.*, (2000) em modelo de animal transgênico da DA, que super-expressa o precursor da proteína amilóide (APP), os níveis de transportadores de glutamato GLAST e GLT1 são reduzidos. No entanto, foi demonstrado em análise de expressão de níveis de RNA mensageiro destas proteínas, que estas se encontram em níveis semelhantes ao controle, sugerindo regulação negativa pós-traducional.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por sintomas clínicos denominados *parkinsonismo*, que incluem bradicinesia, tremor em repouso, rigidez na postura e na marcha (Massano e Bhatia, 2012). Esse perfil está associado à perda de neurônios dopaminérgicos da *substância nigra pars compacta*, assim como a presença de corpos de Lewy intraneurais (Lees *et al.*, 2009). Estudos mostram que o metabolismo neuronal do glutamato é aumentado juntamente com a depleção da dopamina, o que favorece para a progressão da doença, e que esse processo está diretamente ligado ao excesso de ativação de receptores do glutamato, colaborando para a complicação dos sintomas motores na DP (Chassain *et al.*, 2005; Griffith *et al.*, 2008).

Ainda, há outras evidências que relacionam a excitotoxicidade induzida pelo glutamato, como integrante da patogênese da doença de Parkinson. O glutamato é também o transmissor excitatório predominante no gânglio basal, que é a sede dos déficits motores observados em DP (Greenamyre e Porter, 1994). Além de enviar projeções glutamatérgica para o estriado, o córtex também envia projeções para o núcleo subtalâmico (STN), tálamo, e substância Nigra Pars Compacta (SNPC), em adição a outros núcleos do tronco cerebral e da medula espinhal (Albin *et al.*, 1989).

A SNPC recebe inervações glutamatérgicas do STN, que exercem uma importante função reguladora dos gânglios da base no disparo padrão de certas vias glutamatérgicas retroalimentar por consequência da depleção de dopamina na DP (Wichmann e DeLong, 1993). Mais notavelmente, a redução na mensagem dopaminérgica a ser enviada para o estriado resulta em um aumento de atividade da STN causando um aumento na liberação de glutamato para os corpos celulares dopaminérgicos localizados na SNPC, que são ricos em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA, bem como mGluR1 e mGluR2/3 (Rodriguez *et al.*, 1998). Assim, o aumento sustentado do glutamato liberado para uma já comprometida população de células dopaminérgicas desencadeia uma cascata excitotóxica que potencializa a neurodegeneração na doença de Parkinson (Caudle e Zhang, 2009).

A doença de Huntington (DH) é caracterizada por uma disfunção genética autossômica, neurodegenerativa e hereditária que envolve o gene responsável pela expressão da proteína huntingtina em neurônios ligados à captação de glutamato nas entradas corticais. A huntingtina é reconhecida por atuar no controle da apoptose, regular a maquinaria de transporte intracelular e o tráfego de secreção de vesículas. A huntingtina mutante (ou fragmentos) induz a perda dessas funções fisiológicas e adquire funções tóxicas em complexos macromoleculares que regulam a transcrição. Sabe-se que essa proteína mutante é capaz de interferir na neurotransmissão glutamatérgica, na maior ativação dos receptores NMDA e na diminuição da expressão dos transportadores de aminoácidos dos astrócitos (Estrada-Sanchez e Rebec, 2013; Liot *et al.*, 2016; Quintanilla *et al.*, 2016).

Defeitos mitocondriais induzidos pela huntingtina mutante poderiam aumentar os efeitos tóxicos desencadeados por receptores NMDA em DH. Além disso, a disfunção mitocondrial também poderia gerar ERO, gerando um ciclo vicioso deletério para o neurônio. Os principais sintomas clínicos desta patologia consistem em alterações psiquiátricas, motoras e cognitivas, proporcionando neurodegeneração e levando o indivíduo à morte dentro de uma década (Estrada-Sanchez e Rebec, 2013; Liot *et al.*, 2016; Quintanilla *et al.*, 2016).

A isquemia cerebral ou acidente vascular cerebral isquêmico é uma das principais causas de morte no mundo e ocorre devido à diminuição significativa ou a oclusão do fluxo sanguíneo de determinada área cerebral, podendo ser temporária ou permanente (Jean *et al.*, 2012). A falta de disponibilidade de sangue no local da isquemia proporciona uma menor produção de ATP devido à menor disponibilidade

de oxigênio e glicose, apesar de o consumo deste permanecer inalterado. Consequente há um aumento de acidose láctica, desequilíbrio da homeostase iônica e aumento de liberação glutamato para a fenda sináptica, o que leva ao início de uma cascata de sinalização isquêmica. Em excesso, o glutamato liga-se aos iGLURs e desencadeia maior influxo de cálcio, com consequente produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, peroxidação lipídica e ativação de proteínas de morte celular. Além disso, ocorre a formação de edema celular proporcionado pela entrada de água e sódio em decorrência também da excitotoxicidade do glutamato (Xing *et al.*, 2012). Os insultos isquêmicos podem acontecer dentro de segundos a minutos após a oclusão do vaso sanguíneo, podendo durar dias a depender da vulnerabilidade da região afetada, o que proporciona ativação de vias de sinalização de morte neuronal. A excitotoxicidade do glutamato e consequente influxo de cálcio são os principais fatores contribuintes para este processo de morte (Lo *et al.*, 2003; Liu e Murphy, 2009; Moskowitz *et al.*, 2010).

A busca por fármacos que proporcionem a homeostase fisiológica e protejam ou regulem as cascatas de sinalização intracelular de morte neuronal é importante. Tendo em vista a grande variedade de compostos naturais com potencial efeito benéfico à saúde humana, torna-se plausível a bioprospecção de moléculas biologicamente ativas com potencial neuroprotetor, que estejam presentes na alimentação humana. Neste sentido, compostos derivados de vegetais como alcaloides, flavonoides e saponinas têm se mostrado eficientes na manutenção da sobrevivência celular em cultura de células gliais e neuronais. Os flavonoides em particular apresentam um grande efeito neuroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante (Middleton e Kandaswami, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1997).

2.3 FLAVONOIDES

Flavonoides são substâncias que apresentam compostos polifenólicos complexos, sendo dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, os quais fazem parte de uma família com mais de 4.000 diferentes substâncias listadas até a presente data. Eles são classificados em flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis, grupos estes os quais se diferenciam um do outro pela variação do número e posição do grupamento hidroxila, por modificações nos núcleos e pelo grau de metilação e glicosilação (estas últimas afetam diretamente no grau de hidrofobicidade das moléculas) (Harborne e Williams, 2000; Kumar e Pandey, 2013). Os flavonoides podem ser encontrados em uma enorme variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas, verduras, vegetais, sementes e folhas, sendo incluídos de maneira bem significativa na dieta humana (Herrmann, 1976; Hertog, Feskens, *et al.*, 1993; Hertog, Hollman, *et al.*, 1993; Terahara, 2015). No reino vegetal, sua maior concentração quanto à distribuição está no grupo das angiospermas, e são considerados os antioxidantes de natureza vegetal de maior representatividade e diversidade (Zuanazzi, 1999).

A biodisponibilidade plasmática e celular dos flavonoides é um importante parâmetro para avaliação do impacto biológico e seus efeitos. Estes são encontrados na natureza normalmente na forma glicosídica, sendo que para uma melhor absorção intestinal torna-se necessária a hidrólise dos derivados glicosilados. Além disso, outros fatores interferem na absorção dos mesmos, como por exemplo, o etanol, as fibras e a presença de uma microbiota intestinal saudável (com liberação de hidrolases). Após a absorção, a maioria dos compostos é metabolizada no fígado para posterior ação no organismo (Hackett, 1986). Destas, pode-se inferir a ação antibacteriana, antiviral (Hanasaki *et al.*, 1994), anti-inflamatória, antialérgica (Middleton e Kandaswami, 1992); Hanasaki *et al.*, 1994; Hope *et al.*, 1983) e vasodilatadora (Duarte *et al.*, 1993), além de alguns estudos relatarem a ação contra peroxidação lipídica (Ratty e Das, 1988; Mora *et al.*, 1990; Terao *et al.*, 1994; Vinson *et al.*, 1995; Sugihara *et al.*, 1999), indução de agregação plaquetária (Gryglewski *et al.*, 1987; Tzeng *et al.*, 1991; Neiva *et al.*, 1999) e permeabilidade e fragilidade capilar *in vitro* (Torel *et al.*, 1986). Os flavonoides atuam como antioxidantes sequestradores de ERO e de ONOO-, quelantes de cátions divalentes e protetor do DNA, contribuindo para confirmação do efeito protetor em

estudos avaliando o consumo de flavonoides quanto a redução dos níveis de mortalidades por doenças cardiovasculares (Cavallini *et al.*, 1978; Fraga *et al.*, 1987; Afanas'ev *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Hanasaki *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997; Desmarchelier *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1998; Ohshima *et al.*, 1998; Soholm, 1998; Wu *et al.*, 1998; Yokozawa *et al.*, 1998; Arteel e Sies, 1999; Boveris *et al.*, 2000). Estudos ainda são necessários para avaliar a absorção, biodisponibilidade e metabolismo dos flavonoides de acordo com a ingestão normal da dieta humana. Porém, acredita-se que se eles não apresentam toxicidade e se tiverem ativação efetuada no organismo, estes podem ser preventivos quanto à citotoxicidade e a lipoperoxidação mediada por ERO (Maxwell *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1996; Bors e Michel, 1999; Manach *et al.*, 1999; Sugihara *et al.*, 1999).

2.3.1 Efeitos neuroprotetores de flavonoides

O consumo de flavonoides está diretamente associado à redução de riscos de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas na espécie humana. Além disso, estudos demonstram uma potencial ação neuroprotetora contra doenças do SNC em modelos animais, bem como um aumento na aprendizagem e cognição (Engelhart *et al.*, 2002; Weinreb *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2015).

Sabe-se que há uma forte correlação entre menores níveis de demência e o aumento no sucesso do tratamento de condições patológicas neuronais quando associado ao maior consumo de flavonoides na dieta (Beking e Vieira, 2010; Andrade e Assuncao, 2012).

Rutina, que é um flavonoide glicosilado, possui características químicas que lhe confere maior potencial biológico que os não-glicosilados (Figura 1) (Krizkova *et al.*, 2009). Dentre os efeitos biológicos de caráter farmacológico da rutina, estão descritos na literatura o de modular a atividade de enzimas que metabolizam xenobióticos (Hodek *et al.*, 2002), regular negativamente os níveis de VEGF e TGF- β 1 produzidos por células tumorais de origem glial e ainda, de regular positivamente a produção de TNF-alfa e óxido nítrico, como resposta à ativação de células gliais em cultura (Freitas *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008), o que caracteriza sua ação direta em células do sistema nervoso central.

Recentes estudos sugerem este flavonoide como uma potencial substância terapêutica para danos neuronais e forte ação inibitória de neuroinflamação (Hao *et*

al., 2016; Wang e Reddy, 2016). Além disso, propriedades neuroprotetoras têm sido descritas para o tratamento de doenças no SNC e lesões cerebrais secundárias, tais como edema cerebral, destruição da barreira hemato-encefálica, os déficits neurológicos e morte neuronal (Hao *et al.*, 2016).

Indícios de que a rutina apresenta potencial neuroprotetor contra a excitotoxicidade pelo glutamato tornaram-se evidentes em estudo em modelo de isquemia cerebral em ratos, o qual demonstrou que apesar desta não diminuir o volume da lesão, este flavonoide reduziu o número de neurônios degenerados na periferia da lesão e foi capaz de promover a recuperação significativa da perda sensório-motora (Rodrigues *et al.*, 2013).

Neste sentido, o atual estudo tem como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em culturas primárias mistas de células do cerebelo e em culturas organotípicas de cérebro submetidas à excitotoxicidade induzida pelo glutamato e em mitocôndrias isoladas do encéfalo de ratos submetidas ao estresse oxidativo.

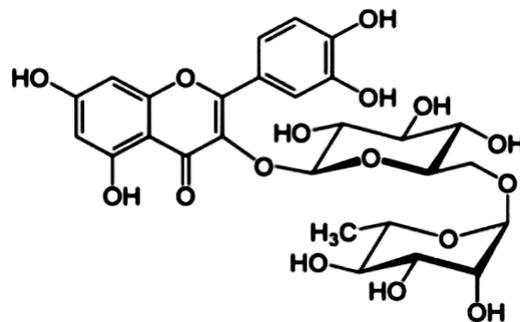


Figura 1. Estrutura química do flavonoide rutina. Fonte: Costa *et al.*, (2016).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em modelos *in vitro* de excitotoxicidade glutamatérgica.

E como objetivos específicos:

1. Estudar o efeito da rutina na prevenção da neurodegeneração induzida por glutamato em culturas organotípicas de cérebro.
2. Estudar o efeito da rutina na atenuação da neurodegeneração como tratamento pós-lesional induzida por glutamato em culturas primárias mistas de cerebelo.
3. Investigar mecanismos de ação da rutina associados à ativação da resposta glial e mitoproteção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELOS DE ESTUDO

4.1.1 Culturas organotípicas de cérebro

Neste estudo, culturas organotípicas do cérebro de ratos Wistar com idade pós-natal de 7 e 9 dias foram utilizadas como modelo biológico de danos induzidos pelo glutamato. Os animais utilizados para as culturas foram obtidos do Biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA e sofreram procedimentos já bem estabelecidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 027/2012).

As culturas organotípicas foram preparadas de acordo com método de (Stoppini *et al.*, 1991) modificado. A região do cérebro, correspondente a 2.700 – 3.150 μm de distância da porção final do bulbo olfatório e início do córtex foi selecionada seguindo diretrizes do Atlas de Estereotaxia (Paxinos & Watson, 2007), com o objetivo de adquirir fatias ricas em neurônios glutamatérgicos corticais.

Os animais foram decapitados e tiveram seus encéfalos expostos e removidos dentro do fluxo laminar. As fatias coronais de cérebro (apresentando córtex frontal) com espessura de 450 μm foram adquiridas utilizando o aparelho Tissue Chopper McIlwain preparadas em condição asséptica e transferidas quatro fatias, sendo duas de cada hemisfério, para cada membrana de microporos de 0,4 μm e 30mm de \varnothing (Millicell® – PICM03050, Millipore, Beldford, MA, USA) acomodada em uma placa de poliestireno de seis poços e cultivadas em meio DMEM/HAM-F12 24,4g/L (Cultilab – cod.: DMEM: D0017/ HAMF12: H0269) suplementado com penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) (Cultilab, SP, Brasil), 292 mg/L de L-glutamina, 3,6g/L de HEPES, 110mg/L de Ácido Pirúvico, 1,2g/L de Bicarbonato de Sódio, 33 mM de glicose e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab SP, Brasil).

As culturas foram incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C durante cinco dias. A troca do meio de cultura foi realizada 48 horas e 96 horas após o lançamento da cultura. No quinto dia de cultura, foram realizados os tratamentos

com o flavonoide rutina e/ou com o glutamato, diluídos em meio de cultivo sem SFB por um período de 24 horas.

4.1.2 Cultura primária mista de células do cerebelo

A escolha da cultura de células cerebelares foi baseada na quantidade de neurônio disponível nessa região, que representa cerca de 70% dos neurônios do encéfalo em ratos. Além disso, essa é uma região rica em neurônios glutamatérgicos (Herculano-Houzel e Lent, 2005). Neste estudo, culturas primárias de cerebelo foram obtidas a partir de ratos Wistar com idade pós-natal entre 7 e 9 dias, sendo utilizada como modelo biológico para indução de danos pelo excesso de glutamato. Os animais utilizados para as culturas foram obtidos do Biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA e sofreram procedimentos já bem estabelecidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 027/2012).

As culturas de células mistas do cerebelo foram obtidas de acordo com (Whittemore *et al.*, 1995) com adaptações. Os ratos Wistar com idade pós-natal entre 7 e 9 dias foram decapitados e os cerebelos foram retirados. Estes foram depositados em meio DMEM HAM F12 (Cultilab – cod.: DMEM: D0017/ HAMF12: H0269) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, SP, Brasil), L-(+)-glutamina (2 mM), 10% (v/v) de glicose, KCl (25 mM), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Cultilab, SP, Brasil). Em seguida os cerebelos foram dissociados mecanicamente com a pipeta Pasteur e a suspensão celular foi filtrada utilizando uma película de *Cell Strainer* (Falcon, Brand – 352360). Posteriormente, a cultura foi centrifugada a temperatura ambiente por 5 minutos a 1.000 x g, o sobrenadante desprezado, e as células ressuspensas em meio com SFB, e contadas em câmara de Neubauer. As células foram semeadas placas de vidro com 8 poços (Millicell® EZ SLIDES) em uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células/cm². As culturas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 72 horas, sem troca de meio. No terceiro dia de cultura, foram realizados os tratamentos com o flavonoide rutina e/ou o glutamato diluídos em meio sem SFB, sendo que a exposição do glutamato sem a rutina ocorreu durante 4 horas (quando

este era utilizado). A rotina foi adicionada aos grupos tratados após esse prazo, totalizando um período de 24 horas de tratamento.

4.2 EXPOSIÇÃO ÀS DROGAS

4.2.1 Tratamento com o flavonoide rutina

O flavonoide rutina foi obtido da Sigma-Aldrich, com 98% de pureza. Este foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 100 mM como solução de estoque, mantida no escuro e submetida à temperatura entre 2° e 8°C. As concentrações finais da rutina utilizadas em cada grupo tratado foram obtidas a partir da concentração de 100mM no momento do tratamento, através de diluições seriadas em meio de cultura sem SFB. Todos os grupos foram tratados com DMSO diluído no meio de cultura em volume equivalente ao utilizado nos grupos tratados com os flavonoides, não ultrapassando a concentração final de 0,01%; que não mostrou nenhum efeito tóxico nos parâmetros analisados em comparação com as células que não receberam o diluente. O momento de tratamento das culturas variou em função do desenho experimental (Figura 2).

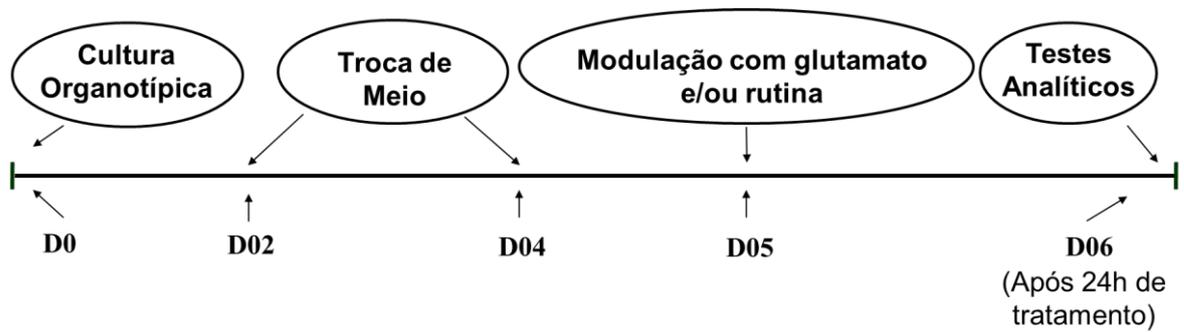
4.2.2 Tratamento com o glutamato

O glutamato foi adquirido do fabricante (G5667 - Sigma Chemical Co. St Louis, USA), sendo pesado e dissolvido em meio DMEM/HAM F12 sem SFB a concentrações entre 20 mM (culturas primárias de cerebelo) e 120 mM (culturas organotípicas de cérebro) para a formação de solução mãe, diluição esta realizada dentro do fluxo laminar. As concentrações finais de glutamato utilizadas em cada grupo tratado foram obtidas a partir das concentrações de 20 mM e 120 mM no momento do tratamento, através de diluições seriadas em meio de cultura sem SFB.

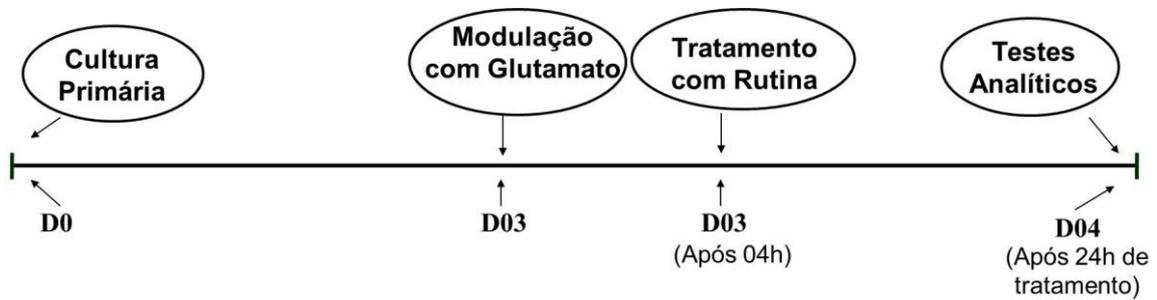
Os grupos tratados foram submetidos à exposição ao glutamato por período de 24 horas. Todos os grupos expostos ao glutamato foram tratados com DMSO diluído no meio de cultura em volume equivalente ao utilizado nos grupos tratados com os flavonoides, não ultrapassando a concentração final de 0,01%, que não mostrou nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados em comparação com

as células que não receberam diluentes. O momento de exposição das culturas variou em função do desenho experimental (Figura 2).

Cultura organotípica de cérebro



Cultura primária mista de células de cerebelo



Isolamento Mitocondrial

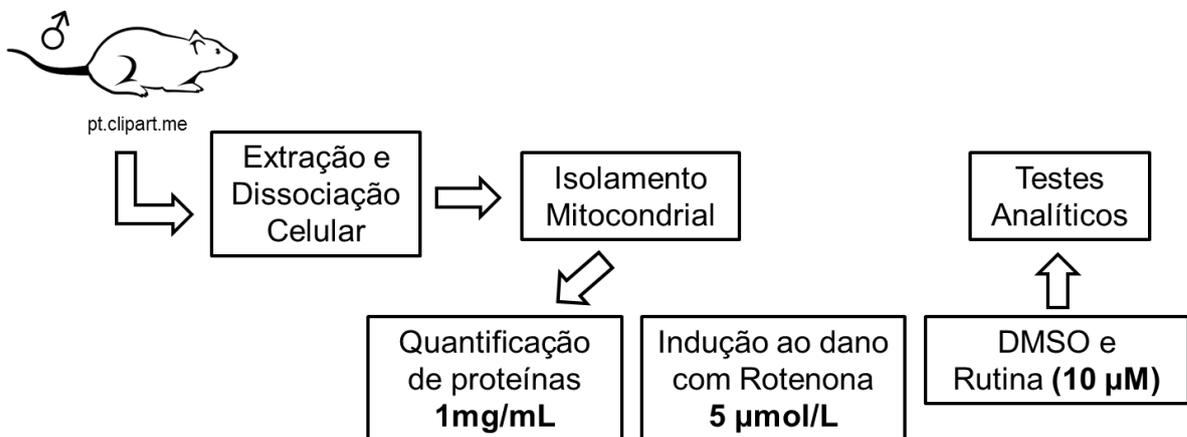


Figura 2: Desenhos experimentais. Representação do fluxo de metodologias empregadas para cada modelo utilizado desde o início do procedimento até a realização dos testes analíticos. D corresponde ao dia.

4.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

4.3.1 Teste de incorporação do Iodeto de Propídio (IP)

Os procedimentos de análise da captação do Iodeto de Propídio em fatias organotípicas foram realizados de acordo com Hoppe *et al.* (2013), com adaptações. Esta técnica permite a visualização da viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana plasmática em culturas celulares utilizando o corante iodeto de propídio, que absorve luz no comprimento de onda de 536 nm e emite a 617 nm. O iodeto de propídio é impermeável em membranas íntegras, e em membranas permeáveis, este se intercala com o DNA e emite fluorescência. Decorrido o período de cultivo das fatias, o meio condicionado de cada poço foi retirado e armazenado, e foi adicionado a solução de Iodeto de Propídio diluída em meio de cultura sem SFB a 5 µg/mL e mantida na estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 1 hora. Após esse prazo, a solução de IP foi desprezada e os poços foram lavados 3 vezes com PBS-glicose (0,6%). As fatias foram observadas em microscópio de fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) e foram realizadas no mínimo três imagens da região cortical de cada fatia de cada tratamento, totalizando uma média de 12 imagens por tratamento. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA), onde apenas as áreas das regiões corticais com morte foram selecionadas. Os resultados foram avaliados pela relação fluorescência/área e a intensidade de fluorescência foi expressa por unidades densitométricas arbitrárias relativas em relação ao controle não tratado.

4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA

4.4.1 Análise da expressão de Glutamina Sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos excitatórios GLAST e GLT1 por *Western Blotting*

Para realização de análise da expressão de proteínas, culturas organotípicas foram tratadas com a rotina nas concentrações 0,5 e 1 µM por 24 horas, e mais o controle com volume equivalente de DMSO a 0,0005%. Após o período de exposição, os sobrenadantes dos grupos tratados foram coletados. Em seguida as

proteínas foram extraídas com tampão de extração (ureia 4mM, SDS 2%, 2mM EGTA, 62,5mM Tris – HCl pH 6,8, 0,5% Triton X-100) contendo 1µL/mL de um coquetel inibidor de proteases (P8340). A concentração de proteínas foi determinada usando o Kit BCA (BIO-RAD) pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Dez microgramas (10µg) de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamina em condições desnaturantes a 12% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno). E de maneira específica, bandas de proteínas foram detectadas com anticorpo primário de coelho para Glutamina Sintetase (1:10.000 Abcam AB49873), anticorpo primário de coelho para EAAT1 (1:2500 Abcam ab416) ou anticorpo primário de coelho para EAAT2 (1:2000 Abcam ab41621). O anticorpo foi diluído em solução de bloqueio (1% de leite desnatado em TBS-T) e mantido em câmara úmida a temperatura entre 2° e 8°C *overnight* e revelado com anticorpo secundário *anti-rabbit* 1:10.000, conjugado com peroxidase extraída de rábano e seu substrato, através de quimioluminescência (kit *Immune Start HRP substrate* – Bio-Rad) e revelação em filme de raio X em câmara escura.

Após a revelação, os filmes de raios X foram escaneados para análise densitométrica das bandas imunorreativas pelo software ImageJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA). Os resultados foram expressos em percentual de Unidades Densitométricas Arbitrárias em relação ao controle não tratado. Como controle de carregamento, utilizamos detecção com anticorpo de coelho específico para Ciclofilina B (1:5000 Abcam 178397) na mesma membrana após procedimento com solução *Stripping*, revelado também por uso de anticorpo secundário conjugado com peroxidase e quimioluminescência.

4.4.2 Extração de RNA e qRT-PCR

As fatias de cada grupo foram destinadas à extração de RNA utilizando o reagente Trizol® (*Invitrogen, Life Technologies*), de acordo com as especificações do fabricante. A integridade e concentração de RNA total foram avaliados utilizando o auxílio do Nano Espectro KASVI (cat# K23-0002), e a síntese do cDNA foi realizada utilizando SuperScript® VILO™ Master Mix (*Invitrogen, Life Technologies™*) seguindo as instruções do fabricante. A PCR em tempo real foi realizado utilizando ensaios de expressão gênica *Taqman®* (*Applied Biosystems*,

CA, USA) que contêm dois iniciadores para amplificar a sequência de interesse e a sonda específica *Taqman*® MGB, marcada com o fluoróforo FAM e com o *TaqMan*® *Universal Master Mix II* (Invitrogen, Life Technologies™). As identificações dos ensaios para os genes quantificados neste estudo foram: GLAST e GLT1. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o instrumento *QuantStudio*™ 7 *Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA). As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. A β -actina e HPRT1 foram utilizados como genes de referência (controles endógenos) para normalização dos dados de expressão gênica.

4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL

4.5.1 Isolamento e tratamentos das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial de gradiente de densidade, conforme descrito por Nunez-Figueredo *et al.* (2014). Os animais utilizados para os testes foram obtidos do Biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA e sofreram procedimentos já bem estabelecidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 027/2012). Ratos Wistar machos adultos com peso corpóreo entre 150g e 200g foram eutanasiados. O encéfalo foi imediatamente removido e transferido para o *Potter* contendo tampão de isolamento composto de sacarose 75 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, manitol 225 mmol/L, ASB 0,1 % e HEPES-KOH 10 mmol/L, em pH 7,2 e dissociado mecanicamente. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 2.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante resultante coletado e centrifugado a 12.000 x g por 8 minutos. O sedimento desta centrifugação foi ressuspenso em 10 mL do tampão de isolamento contendo 20 μ L de digitonina a 10 %, que foi utilizada com a função de abertura de sinaptossomas para liberação das mitocôndrias, e novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento final foi suavemente lavado e ressuspenso em tampão de isolamento desprovido de EGTA, a uma concentração de proteína de aproximadamente 30 e 40 mg/mL. Todo o procedimento de isolamento foi efetuado a 4 °C (Nunez-Figueredo *et al.*, 2014). Para determinação da

concentração de proteínas empregou-se o método de Lowry *et al.* (1951), sendo o meio de reação utilizado como padrão.

Após isolamento, as mitocôndrias foram mantidas em meio de incubação, contendo KCl 130 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L e HEPES-KOH fosfato 2 mmol/L, em pH 7,4, com o tubo onde ela estava contida imerso no gelo. Nos experimentos subsequentes para avaliação da atividade mitocondrial, as mitocôndrias (referidas como 1 mg de proteína/mL) passaram pelo processo de energização com succinato de potássio (5 mmol/L), juntamente com o dano oxidativo induzido por rotenona (5 µmol/L), que é um inibidor do complexo I e IV da cadeia respiratória amplamente utilizado como modelo de dano (Nunez-Figueroa *et al.*, 2014), além do tratamento com a rutina a 10 µM. Os controles não foram tratados com o flavonoide. As análises foram realizadas 10 min após os tratamentos.

4.5.2 Análise do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado imediatamente após incubação com os diferentes tratamentos por análise espectrofluorimétrica. Para tanto, foi utilizada como marcador fluorescente a safranina O (10 µM), um cátion lipofílico que se acumula em membranas mitocondriais proporcionalmente ao potencial de membrana (Zanotti e Azzone, 1980; Kowaltowski *et al.*, 2009; Vercesi, 2001). O nível de fluorescência foi avaliado em um fluorímetro (Varioscan Thermo, Finlândia) a 495/586 nm de excitação/emissão.

4.5.3 Análise produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A quantidade de H₂O₂ gerada pelas mitocôndrias foi medida através da oxidação do Amplex Red 50 µM, na presença da peroxidase (U/mL), ao composto fluorescente denominado resorufina. As medidas do nível de fluorescência foram feitas utilizando um fluorímetro (Varioscan Thermo, Finlândia), com comprimento de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente (Votyakova e Reynolds, 2001; Pardo-Andreu *et al.*, 2011).

4.6 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CEREBELO

4.6.1 Análise da degeneração neuronal por Fluoro-Jade B (FJB)

Para realização deste ensaio, utilizou-se o reagente Fluoro-Jade B (Milipore, AG310), um marcador fluorescente de elevada afinidade para a localização de degeneração neuronal (OH et al., 2015). As células do cerebelo foram cultivadas em placas de vidro com 8 poços (Millicell® EZ SLIDES), numa densidade de $5,0 \times 10^4$ células/cm². Foram realizados tratamentos com o glutamato na concentração de 10 mM durante 4 horas, posteriormente tratados com o flavonoide rutina 0,5 µM e mantidas por um período de 24 horas contadas a partir da modulação com o glutamato. Culturas tratadas somente com DMSO (0,0005%) foram adotadas como controle. O sobrenadante das culturas foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) a temperatura de 4°C, por 10 minutos. As culturas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com PBS/Triton X-100 a 0,3%, por 10 minutos. Decorrido o período, as culturas foram lavadas 3 vezes com água destilada e incubadas com a solução de Fluoro-Jade B 0,001%, por 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação lenta e protegidas da luz. Em seguida, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com um agente fluorescente intercalante de DNA 4',6-diamidino-2-phenilindol diidrocloreto (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) por 5 minutos, e lavadas novamente com PBS. Em seguida, as culturas foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus® modelo AX70 e fotografadas utilizando uma câmara digital (CE Roper Scientific). O resultado da quantificação da degeneração neuronal foi avaliado mediante a correlação da contagem de células fluorescentes desses dois marcadores celulares nos grupos tratados e apresentado em porcentagem pela relação entre Fluoro-Jade B/DAPI.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para cada análise, foram realizados três experimentos independentes, cada um com amostragem em triplicata. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (California, EUA) e registrados como média \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística

entre os grupos, foi realizada uma análise de variância através do teste One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls. O teste t-Student, para amostras independentes, foi usado para comparar dois grupos de dados quantitativos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 RUTINA REDUZ INCORPORAÇÃO DE IP EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

Nossos resultados demonstraram que a rutina (0,5 e 1 μ M) não foi tóxica para cultura organotípica de cérebro em tratamentos de 24 h, quando comparada ao grupo controle. Além disso, foi demonstrado que o glutamato (60 mM) induziu toxicidade em células corticais da cultura organotípica por aumentar em $74,5 \pm 25,25\%$ os níveis da intensidade de fluorescência relativa à incorporação do IP, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, foi visualizado que a rutina, em concentrações de 0,5 e 1 μ M, induziu proteção contra a toxicidade do glutamato em células corticais da cultura organotípica, por reduzir de $174,5 \pm 48\%$ para $122,5 \pm 32,72\%$ e $85,9 \pm 15,17\%$ os níveis da intensidade de fluorescência, respectivamente, em relação ao grupo tratado com glutamato (Figura 3).

5.2 RUTINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GS EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

A avaliação por *Western Blotting* da expressão da enzima Glutamina Sintetase demonstrou que os grupos tratados somente com a rutina (0,5 μ M) diminuíram a expressão da GS em $19,75 \pm 6,37\%$ após 24h de tratamento sem o dano pela excitotoxicidade do glutamato em relação ao grupo controle (DMSO). Também foi demonstrado que, nos grupos tratados somente com o glutamato (60 mM), este não foi capaz de modificar significativamente a expressão da GS. No entanto, foi observado em culturas organotípicas tratadas concomitantemente com glutamato (60 mM) e rutina (0,5 μ M) um aumento da expressão da GS em $16,1 \pm 11,8\%$ em relação ao grupo controle (DMSO) (Figura 4).

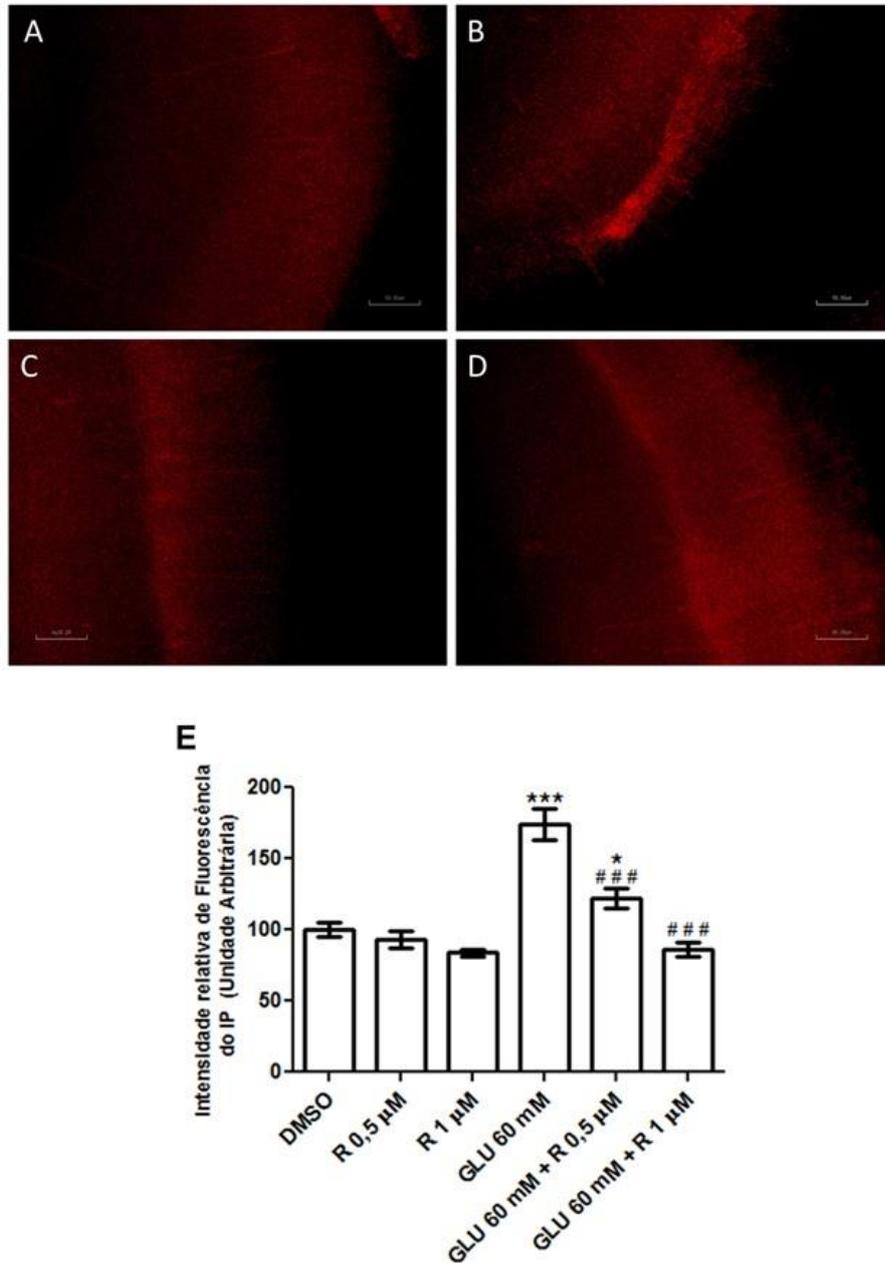
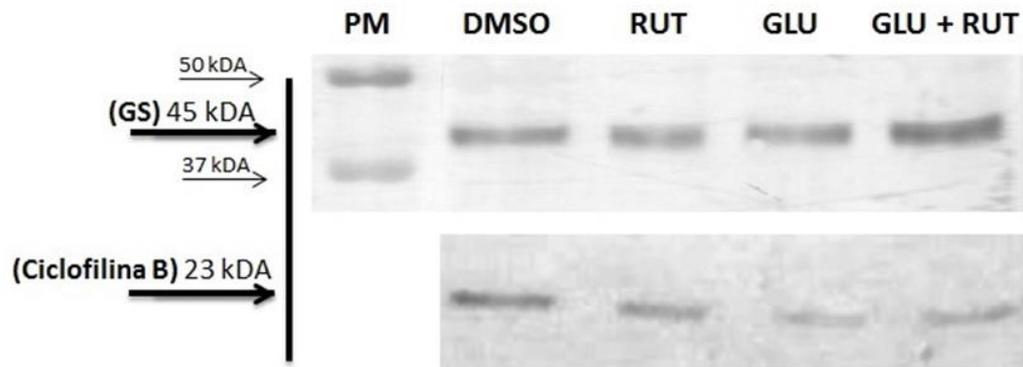


Figura 3: Análise de viabilidade celular através da incorporação do iodeto de propídio (IP) em culturas organotípicas de cérebro. Em A, cultura em condição controle (DMSO 0,0005%). Em B, cultura exposta por 24h a 60 mM de glutamato (GLU). Em C, cultura tratada com 0,5 μM de rutina (R). Em D, cultura tratada concomitantemente com 60 mM de glutamato e 0,5 μM de rutina. Obj. 4X. Barras de escala representam 50.000 μm. Em E, quantificação da intensidade de fluorescência do IP incorporado. Os valores representam médias \pm desvio padrão ($n = 3$) da intensidade relativa de fluorescência por área analisada em software ImageJ. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova para múltipla comparação e pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle; *** $p < 0,001$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle; ### $p < 0,001$, representa diferença estatística em relação às culturas expostas a 60 mM de glutamato.

A



B

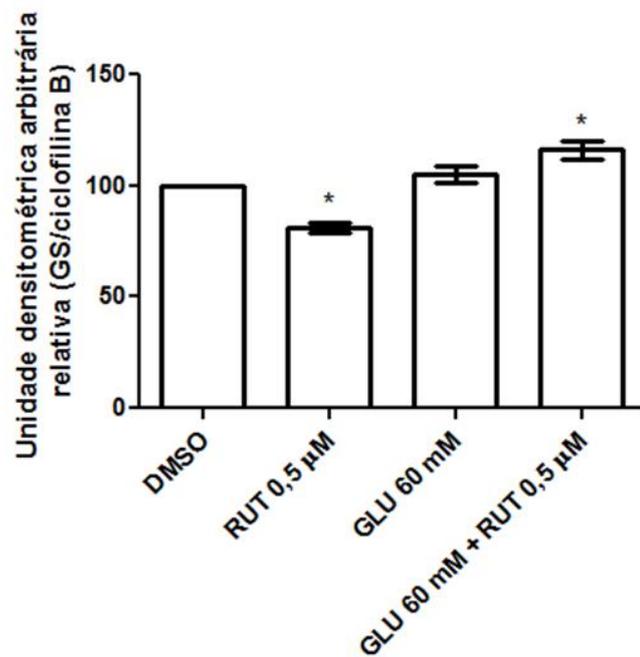


Figura 4. Ensaio de modulação da expressão de glutamina sintetase (GS) por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do *Western Blotting*. Foram usados DMSO (0,0005%) como controle, e tratamento com glutamato (GLU) 60 mM e/ou rutina 0,5 µM durante 24h de tratamento. Em A, bandas imunorreativas para glutamina sintetase (45 kDA) e Ciclofilina B (23 kDA). Em B, gráfico representa razão entre unidades densitométricas arbitrárias da expressão de GS por expressão de Ciclofilina B. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova para múltipla comparação e pós-teste Newman-Keuls, * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle.

5.3 RUTINA MODULA A EXPRESSÃO DE GLAST E DE GLT1 EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

A avaliação da expressão da proteína GLAST por *Western Blotting* demonstrou que, nos grupos tratados somente com a rutina (0,5 μ M), esta não foi capaz modificar a expressão do transportador quando comparado ao grupo controle (DMSO). Por outro lado, foi demonstrado que, nos grupos tratados somente com o glutamato (60 mM) houve aumento da expressão da GLAST de 100% para $132,8 \pm 13,17\%$ em relação ao grupo controle (DMSO). Também foi observado que a rutina (0,5 μ M) amplificou o aumento da expressão da GLAST em tratamentos concomitantes com glutamato para $151,4 \pm 17,76\%$, em relação aos grupos controle e grupo glutamato.

Já a avaliação por *Western Blotting* da expressão da proteína transportadora GLT1 assinalou que, nos grupos tratados somente com a rutina (0,5 μ M), esta induziu diminuição da expressão da GLT1 em $14 \pm 11,56\%$ em relação ao grupo controle (DMSO). No entanto, os grupos tratados com o glutamato (60 mM) e o glutamato (60 mM) associado à rutina (0,5 μ M) não sofreram modificações na expressão da proteína GLT1 em relação ao grupo controle (Figura 5).

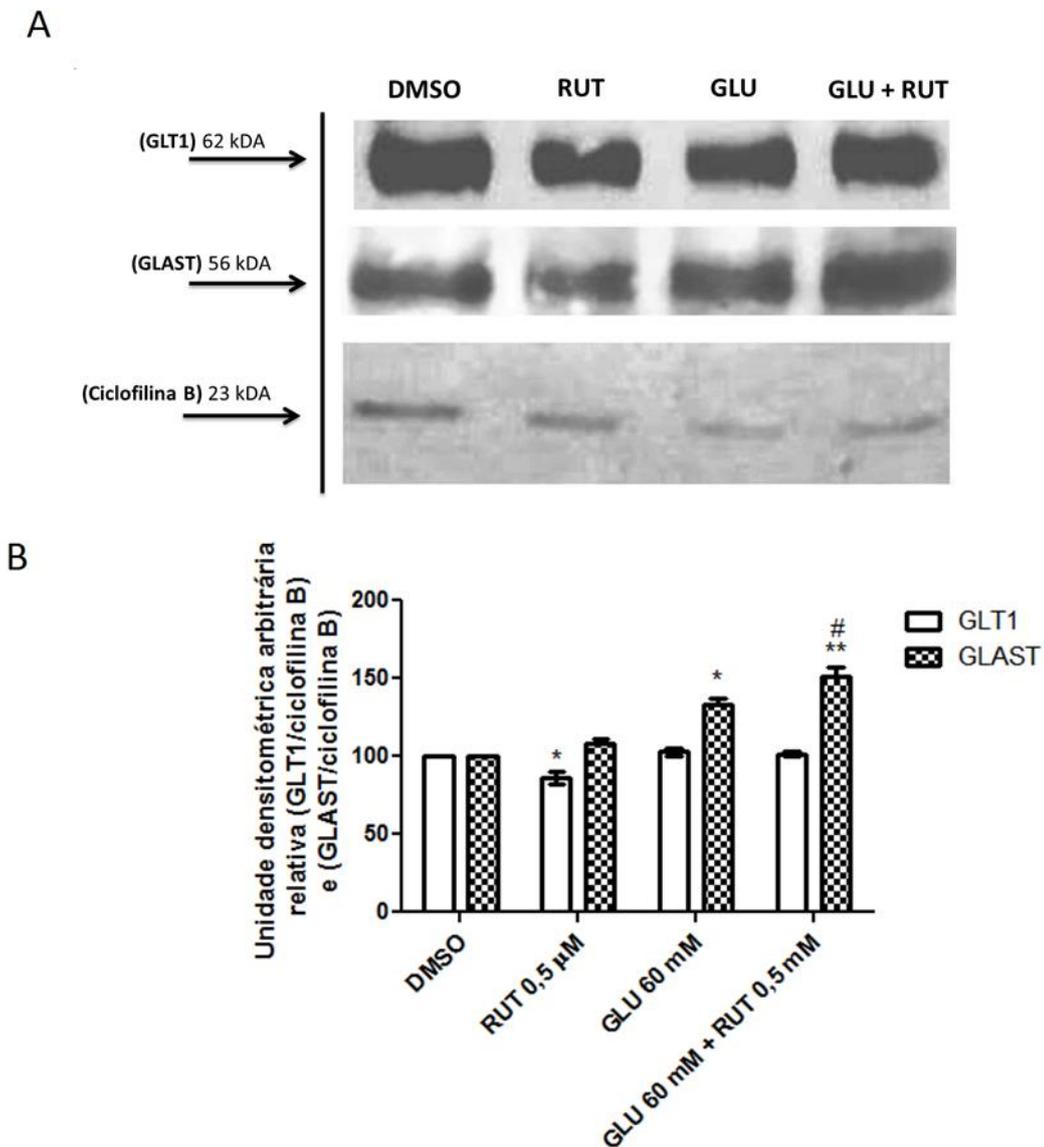


Figura 5. Ensaio de modulação da expressão das proteínas transportadoras GLAST e GLUT1 por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do *Western Blotting*. Foram usados DMSO (0,0005%) como controle, e tratamento com glutamato (GLU) 60 mM e/ou rutina 0,5 μM durante 24h de tratamento. Em A, bandas imunorreativas para GLUT1 (62 kDa), para GLAST (56 kDa) e para Ciclofilina B (23 kDa). Em B, gráfico representa razão entre unidades densitométricas arbitrárias da expressão de GLUT1 e de GLAST por expressão de Ciclofilina B. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova para múltipla comparação e pós-teste Newman-Keuls, * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle; ** $p < 0,001$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle; # $p < 0,001$, representa diferença estatística em relação às culturas expostas a 60 mM de glutamato.

5.4 RUTINA MODULA NÍVEIS DE mRNA DE GLAST EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE CÉREBRO

A avaliação da modulação dos níveis de mRNA da proteína GLAST via RTq-PCR demonstrou que, nos grupos tratados somente com rutina (0,5 μ M), esta foi capaz de induzir aumento dos níveis de mRNA deste transportador em $294,5 \pm 38,89\%$ quando comparado ao grupo controle em 100% (DMSO). No entanto, foi demonstrado que, nos grupos tratados somente com glutamato (60 mM), este não induziu aumento nos níveis de mRNA em relação ao grupo controle (DMSO). Já nos grupos tratados concomitantemente com a rutina (0,5 μ M) e o glutamato (60 mM), foi observado que os níveis de mRNA deste transportador aumentaram em $526,5 \pm 21,82\%$ (Figura 6).

Já a avaliação da modulação dos níveis de mRNA da proteína GLT-1 via RTq-PCR assinalou que não houve diferença entre todos os grupos tratados (Figura 6).

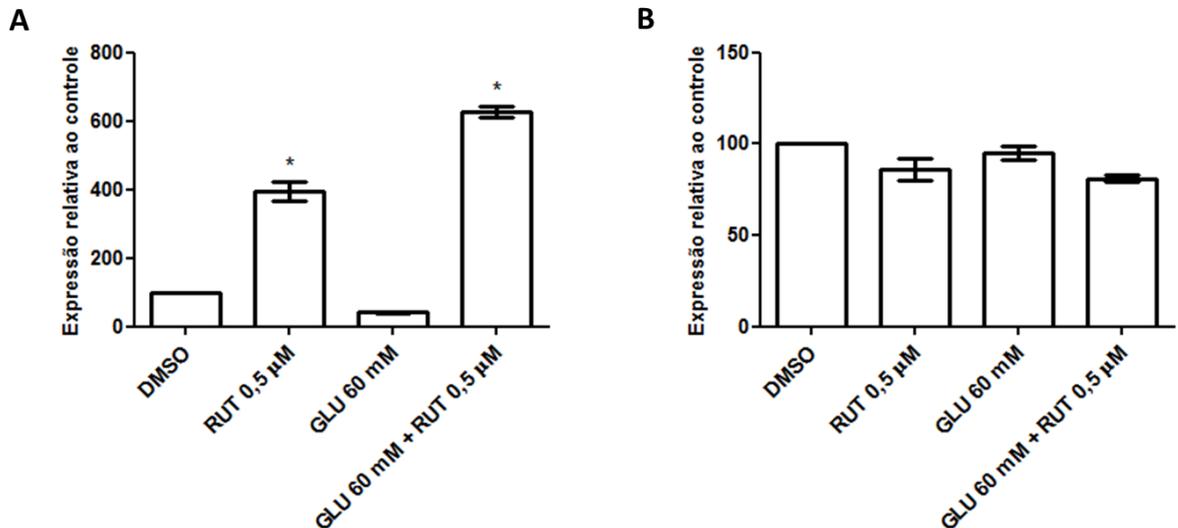


Figura 6. Análise dos níveis de mRNA das proteínas transportadoras GLAST e GLT1 por ação da rutina (RUT) em culturas organotípicas de cérebro através do RTq-PCR. Foram usados DMSO (0,0005%) como controle, e tratamento com glutamato (GLU) 60 mM e/ou rutina 0,5 μ M durante 24h de tratamento. Em A, gráfico representa a análise da expressão relativa ao controle da proteína GLAST. Em B, gráfico representa a análise da expressão relativa ao controle da proteína GLT1. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova para múltipla comparação e pós-teste Newman-Keuls, * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle.

5.5 RUTINA APRESENTA EFEITO PROTETOR EM MITOCONDRIAS ISOLADAS DE CEREBRO DE RATOS

Os resultados mostram que a rutina na concentração de 10 μM foi capaz de reduzir em $35,47 \pm 4 \%$ a dissipação do potencial de membrana induzida por rotenona em mitocôndrias isoladas do cérebro de ratos quando comparado com a condição controle (DMSO 0,01%) (Figura 7A). Além disto, foi observado que a rutina na concentração de 10 μM , também foi capaz de reduzir em $38,1 \pm 7,8 \%$ os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio quando comparada ao grupo controle (DMSO 0,01%) (Figura 7B).

A análise comparativa entre o grupo controle negativo (CT) e o grupo DMSO 0,01%, ambos sem tratamento, demonstrou não haver diferenças para ambos os parâmetros avaliados.

5.6 PÓS-TRATAMENTO COM RUTINA NÃO REDUZ A MORTE NEURONAL EM CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE CEREBELO

A análise da degeneração neuronal por Fluoro-Jade B após tratamento de culturas cerebelares com rutina (0,5 μM) e/ou glutamato (10 mM) mostrou no grupo tratado com a rutina (0,5 μM) percentual de células FJB positivas semelhante ao do grupo controle, indicando que os neurônios nestas condições permaneceram viáveis após 24 h de tratamento. No entanto, o tratamento com o glutamato (10 mM) induziu aumento de $3,14 \pm 2,89\%$ do grupo controle para $16,37 \pm 6,14 \%$ no percentual de células FJB positivas (Figura 8).

O tratamento com glutamato e seguido após 4h de rutina não reduziu o percentual de células FJB positivas, quando comparado ao grupo glutamato, por aumentar de $3,14 \pm 2,89\%$ para $14,2 \pm 5,30 \%$ os níveis de morte neuronal em relação ao grupo controle (Figura 8).

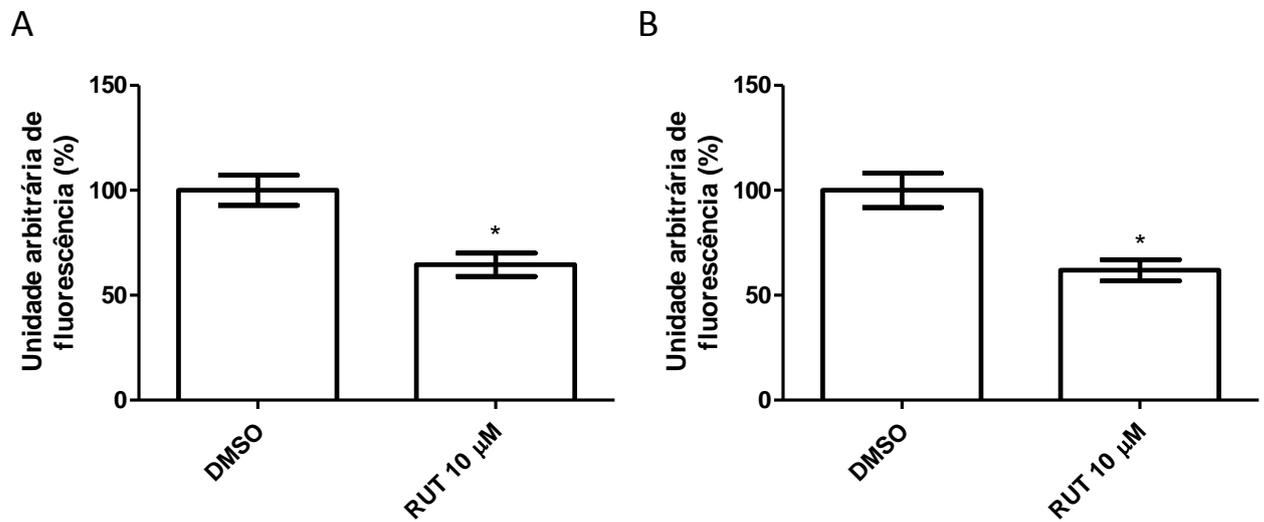


Figura 7. Avaliação da função de mitocôndrias isoladas de encéfalo de ratos machos Wistar adultos incubados com rotenona (5 µmol/L). Em A, avaliação da dissipação do potencial de membrana de mitocôndrias isoladas após 10 minutos de exposição aos compostos DMSO 0,01% e rutina 10 µM (RUT) usando a Safranina O como marcador, mensurada pela intensidade de fluorescência a 495/586 nm de excitação/emissão. Em B, avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas após 10 minutos de exposição aos compostos DMSO 0,01% e rutina 10 µM usando o Amplex Red como marcador, mensurada pela intensidade de fluorescência 563/587 nm de excitação/emissão. A análise de variância foi realizada usando o teste t-Student para amostras independentes, para comparar dois grupos de dados quantitativos. * Valor de $p < 0,05$, diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (DMSO 0,01%).

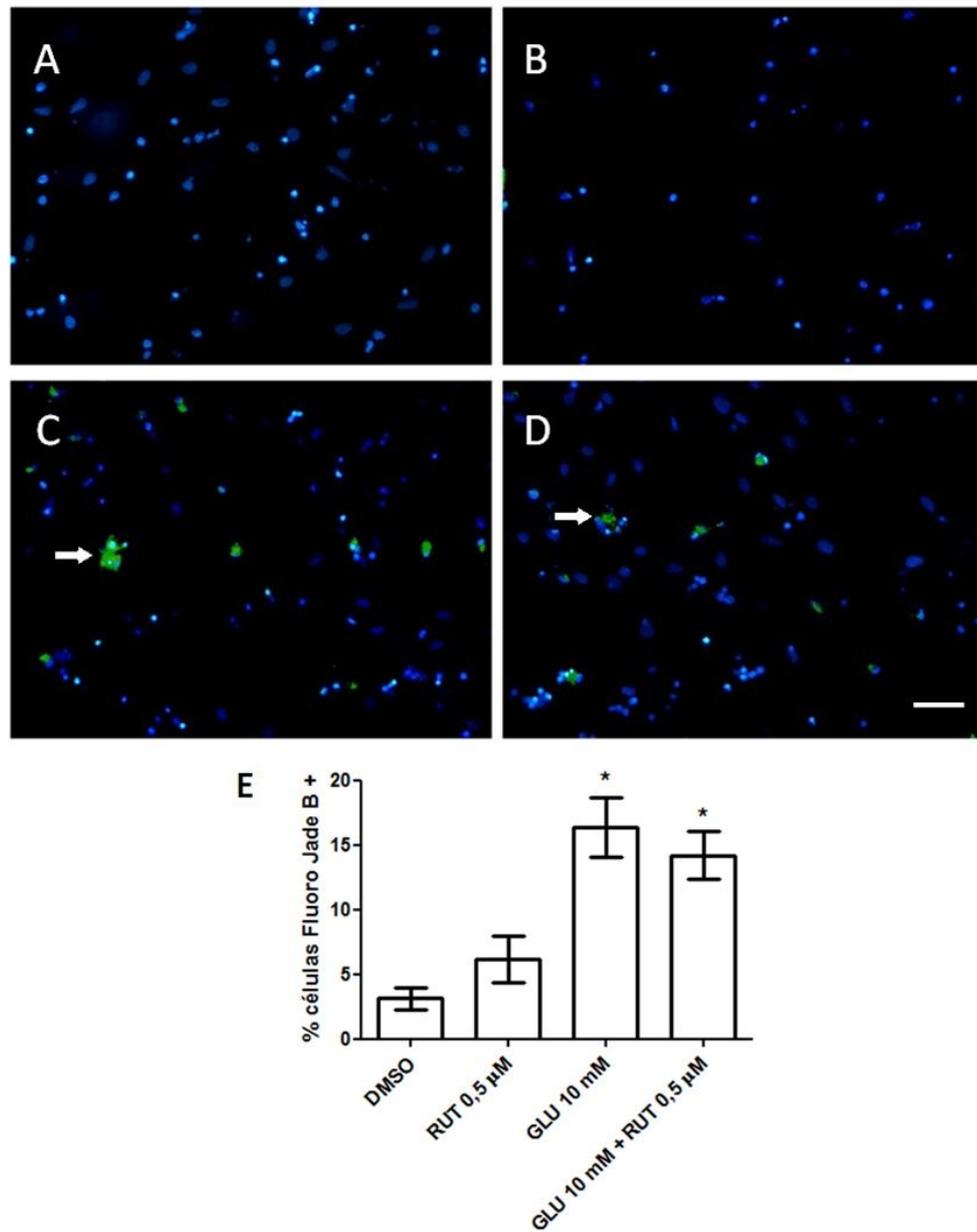


Figura 8: Análise da degeneração neuronal através da coloração com Fluoro-Jade B e marcação de núcleos com DAPI em culturas primárias mistas de cerebelo. Em A, cultura corada após período de tratamento em condição controle (DMSO 0,0005%). Em B, cultura corada após 24h de tratamento com 0,5 μM de rutina (RUT). Em C, cultura corada após 24h de exposição a 10 mM de glutamato (GLU). Em D, cultura corada após exposição a 10 mM de glutamato e tratamento com 0,5 μM de rutina. As imagens foram registradas por microscopia de fluorescência (Obj. 20 x 0.70), barra de escala = 50 μm. Em C e D, setas brancas indicam células Fluoro-Jade B positivas. Em E, quantificação de células Fluoro-Jade B positivas por núcleos corados com DAPI. Os valores representam medias ± desvio padrão (n = 3) do percentual de células Fluoro-Jade B positivas. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova para múltipla comparação e pós-teste Newman-Keuls. *p < 0,05, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle.

6. DISCUSSÃO

Os modelos de estudos de células do SNC *in vitro* são essenciais para a pesquisa celular em um ambiente isolado, em especial os modelos de culturas primárias e organotípicas. Estas técnicas permitem a utilização de um número reduzido de animais experimentais, além da redução dos seus sofrimentos por não haver necessidade de procedimentos cirúrgicos demorados, como visualizados em estudos *in vivo*. Outro fator é que este modelo permite uma melhor avaliação nos tratamentos de simulações de doenças neurodegenerativas por não serem influenciadas por possíveis complicações de penetração cerebral ou de instabilidade metabólica. Em especial, as culturas organotípica destacam-se das culturas dissociadas por, além de permitirem o estudo da morfologia, função, sobrevivência e a utilização de potenciais agentes de dano ou proteção celular, elas são capazes de preservar a organização estrutural e sináptica do tecido original. Essa característica confere à cultura organotípica um passo importante à frente na simulação de situações de desordens neuronais *in vivo*. Devido a essa característica, esse modelo de estudo foi o escolhido para realização da maioria dos ensaios de neuroproteção no presente trabalho (Cho *et al.*, 2007; Ziobro *et al.*, 2011; Humpel, 2015; Piwonska *et al.*, 2016).

Estudos com fatias de cérebro com foco no córtex cerebral ou a utilização da excitotoxicidade do glutamato em modelos de estudo de neurodegeneração e de neuroproteção são bem descrito na literatura, no entanto o uso em conjunto de ambas as metodologias ainda não foi muito descrito (Bendfeldt *et al.*, 2007; Camenzind *et al.*, 2010; Wang e Zhu, 2012). Este trabalho é inovador na identificação de mecanismos de ação da rutina associados à expressão de transportadores de aminoácidos excitatórios em modelo de excitotoxicidade glutamatérgica usando cultura organotípica de cérebro (com foco no córtex cerebral) e pode estimular mais estudos na área acerca dessa desordem, além de incentivar a utilização do flavonoide rutina em estudos e pesquisas pré-clínicas em humanos para o desenvolvimento de novo fármaco neuroprotetor.

A morte celular induzida pelo glutamato caracterizada em nosso trabalho em culturas organotípicas foi inibida por tratamentos com o flavonoide rutina. Estudos têm demonstrado que dentre os mecanismos de ação no sistema nervoso já foram

relatados efeitos antioxidantes e modulador da resposta glial (Silva *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2013). Neste sentido, buscamos neste trabalho esclarecer a associação do mecanismo antioxidante com uma possível proteção mitocondrial e a ação sobre células gliais, com a modulação da expressão da principal enzima envolvida no metabolismo do glutamato, a glutamina sintetase astroglial e a modulação da expressão dos transportadores de aminoácidos excitatórios desta mesma célula.

A ação de astrócitos no efeito neuroprotetor diante da excitotoxicidade do glutamato parece estar diretamente associada à sua atuação detoxificadora, visto que estas células contêm transportadores (EAAT) e enzimas (GS) capazes de reduzir níveis excedentes de glutamato (Swanson *et al.*, 2004; Foran e Trotti, 2009). Estudos vêm demonstrando que a rutina induz ativação de astrócitos, marcada pelo aumento da expressão de GFAP (Silva *et al.*, 2008) e que a ação da GS está diretamente relacionada com a astrogliose, de forma que o aumento da expressão desta enzima tem sido usado como um marcador metabólico do fenômeno (Sandberg *et al.*, 1985; Condorelli *et al.*, 1989). Ainda que Martini *et al.* (2007) tenham demonstrado que a rutina não interferiu na ligação do glutamato com receptores, na captação deste por vesículas sinápticas, na captação deste por astrócitos e na liberação de glutamato pelas vesículas sinápticas, nossos achados demonstraram que a rutina aumentou a expressão de GS em culturas organotípicas de cérebro, que é um importante mecanismo associado à regulação de níveis deste neurotransmissor.

Estudos de Martini *et al.* (2007) foram realizados expondo culturas de astrócitos a níveis fisiológicos de glutamato (100 μ M) e ensaios de dosagem de LDH (Desidrogenase láctica) não demonstram indução de citotoxicidade. Em nosso estudo, em condições sem adição de altos níveis de glutamato, a rutina induziu redução da expressão de GS e GLT1, demonstrando que esta pode regular o metabolismo deste neurotransmissor sem afetar a viabilidade neuronal, uma vez que não foi observada alteração associada à incorporação de iodeto de propídio nestas condições. Por outro lado, no nosso estudo, quando em condições com altos níveis de glutamato, a rutina foi capaz de aumentar a expressão de proteína GLAST neste mesmo modelo. Estes achados corroboram com os resultados obtidos na análise do RT qPCR para estes transportadores de glutamato, onde foi observado que, em grupos tratados com rutina e/ou glutamato não há alteração nos níveis de mRNA

para GLT1. Entretanto, nos grupos onde a rutina está presente (com ou sem glutamato) há aumento nos níveis de produção de mRNA para GLAST. Neste sentido, a rutina parece estar atuante no mecanismo de neuroproteção através do aumento da expressão de proteínas GS e GLAST, importantes no processo de detoxificação do excedente deste aminoácido excitatório por astrócitos.

A disfunção mitocondrial é um fator que está diretamente associado às doenças neurodegenerativas ligadas a excitotoxicidade glutamatérgica (Beal, 1995; Schinder *et al.*, 1996; Ju *et al.*, 2009). Nossos resultados demonstraram que além da redução de espécies reativas de oxigênio mitocondrial induzida por rotenona, a rutina também inibiu a dissipação do potencial de membrana demonstrando um efeito mitoprotetor. Com esse achado, sugere-se que a rutina favoreça a manutenção da produção de ATP mitocondrial e colabora para a manutenção da homeostase fisiológica e consequente viabilidade celular (Schulz *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2009), desta forma, caracterizando um possível mecanismo de ação neuroprotetora da rutina para a morte neuronal visualizada em nossos modelos induzidos por glutamato.

Os ensaios de proteção em culturas organotípicas demonstraram que a rutina apresenta um potencial neuroprotetor que pode ser aplicado na busca de fármaco para enfermidades neurodegenerativas progressivas de caráter lento ou de um fármaco neuroprotetor profilático (Caudle e Zhang, 2009; Campos-Peña e Meraz-Ríos, 2014). Para avaliar se esta ação neuroprotetora também se aplica a condições súbitas de aumento da liberação de glutamato, como ocorre em acidente vascular cerebral (Rothman, 1984), em que pacientes são submetidos a tratamentos horas após o início do dano neuronal, realizamos ensaios de pós-tratamento com rutina em culturas primárias. Nestas condições a rutina não foi capaz de realizar uma ação neuroprotetora, como visualizado nos ensaios de degeneração neuronal por Fluoro-Jade B. Esses dados nos mostraram que a rutina pode proteger neurônios contra danos pela excitotoxicidade do glutamato quando presente no SNC no momento da lesão excitotóxicas, mas não em processo neurodegenerativo já instalado. Sugerimos que isto acontece, porque a rutina pode atuar no processo inicial da detoxificação contra a excitotoxicidade favorecendo a prevenção contra este dano e não como agente restaurador, o que proporciona maior viabilidade celular em tratamentos concomitantes a altos níveis de glutamato, como visualizado em nossos resultados.

O presente estudo elucidou novos mecanismos de ação neuroprotetora do flavonoide rutina diante da excitotoxicidade induzida pelo glutamato através de distintas vias, e que juntamente com estudos descritos na literatura sobre ação neuroprotetora desta molécula estimula a sua aplicação em estudos pré-clínicos, visto que, compostos metabólicos que apresentem efeito antioxidante, mitoprotetor e neuroprotetores, podem ser possíveis fármacos de prevenção à cascata de eventos que são sucedidos após o insulto excitotóxico mediado por este aminoácido e consequentemente direcionados para diferentes enfermidades do SNC.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a rutina é um agente neuroprotetor que previne a excitotoxicidade e sugere-se que esse efeito envolva proteção mitocondrial e regulação de metabolismo astrocitário através da modulação da expressão de proteínas envolvidas no processo de detoxificação do glutamato. No entanto, mais estudos são cruciais, a fim de elucidar mais mecanismos moleculares de neuroproteção induzida por rutina contra danos causados por glutamato e compreender melhor o papel das células gliais, especialmente astrócitos e microglia na bioatividade de rutina.

REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 38, n. 11, p. 1763-9, Jun 1 1989. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952.

AGUIRRE, A.; GALLO, V. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. **J Neurosci**, v. 24, n. 46, p. 10530-41, Nov 17 2004. ISSN 0270-6474.

ALBIN, R. L.; GREENAMYRE, J. T. Alternative excitotoxic hypotheses. **Neurology**, v. 42, n. 4, p. 733-8, Apr 1992. ISSN 0028-3878 (Print)

0028-3878.

ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 366-75, Oct 1989. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236.

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 165-79, Nov 2001. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491.

AMANI, N. et al. Chlorpyrifos Toxicity in Mouse Cultured Cerebellar Granule Neurons at Different Stages of Development: Additive Effect on Glutamate-Induced Excitotoxicity. **Cell J**, v. 18, n. 3, p. 464-72, Fall 2016. ISSN 2228-5806 (Print)

2228-5806.

ANDRADE, J. P.; ASSUNCAO, M. Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 1, p. 4-14, 2012. ISSN 1381-6128.

ARAQUE, A.; NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1551, p. 2375-81, Aug 12 2010. ISSN 0962-8436.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. **FEBS Lett**, v. 462, n. 1-2, p. 167-70, Nov 26 1999. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

AZEVEDO, F. A. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J Comp Neurol**, v. 513, n. 5, p. 532-41, Apr 10 2009. ISSN 0021-9967.

AZEVEDO, M. I. et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Mol Pain**, v. 9, p. 53, 2013. ISSN 1744-8069.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019-31, Mar 19 2011. ISSN 0140-6736.

BAR-PELED, O. et al. Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. **J Neurochem**, v. 69, n. 6, p. 2571-80, Dec 1997. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Neurol**, v. 38, n. 3, p. 357-66, Sep 1995. ISSN 0364-5134 (Print)

0364-5134.

BEKING, K.; VIEIRA, A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. **Public Health Nutr**, v. 13, n. 9, p. 1403-9, Sep 2010. ISSN 1368-9800.

BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 11, n. 3, p. 281-95, 2009. ISSN 1294-8322 (Print)

1294-8322.

BENDFELDT, K. et al. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: a new in vitro model of the blood-brain barrier. **J Neurosci**, v. 27, n. 12, p. 3260-7, Mar 21 2007. ISSN 0270-6474.

BERLIOCCHI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1464, p. 2255-8, Dec 29 2005. ISSN 0962-8436 (Print)

0962-8436.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 11-12, p. 1413-26, Dec 1999. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

BOVERIS, A. et al. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 121-35, 2000. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923.

BRADL, M.; LASSMANN, H. Oligodendrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 37-53, Jan 2010. ISSN 0001-6322.

BUTT, A. M. et al. PDGF-alpha receptor and myelin basic protein mRNAs are not coexpressed by oligodendrocytes in vivo: a double in situ hybridization study in the anterior medullary velum of the neonatal rat. **Mol Cell Neurosci**, v. 8, n. 5, p. 311-22, 1997. ISSN 1044-7431 (Print)

1044-7431.

CAJAL, S. R. Histology of the Neurons System of Man and Vertebrates. **Oxford University Press**, 1995.

CAMENZIND, R. S. et al. Preservation of transendothelial glucose transporter 1 and P-glycoprotein transporters in a cortical slice culture model of the blood-brain barrier. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 361-71, Sep 29 2010. ISSN 0306-4522.

CAMPOS-PEÑA, V.; MERAZ-RÍOS, M. A. **Alzheimer Disease: The Role of A β in the Glutamatergic System**. 2014. Disponível em: <
<http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/neurochemistry/alzheimer-disease-the-role-of-a-in-the-glutamatergic-system> >.

CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Exp Neurol**, v. 220, n. 2, p. 230-3, Dec 2009. ISSN 0014-4886.

CAVALLINI, L.; BINDOLI, A.; SILIPRANDI, N. Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. **Pharmacol Res Commun**, v. 10, n. 2, p. 133-6, Feb 1978. ISSN 0031-6989 (Print)

0031-6989.

CHASSAIN, C. et al. Cerebral glutamate metabolism in Parkinson's disease: an in vivo dynamic (¹³C)NMS study in the rat. **Exp Neurol**, v. 191, n. 2, p. 276-84, Feb 2005. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886.

CHEN, Y. T. et al. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radic Biol Med**, v. 9, n. 1, p. 19-21, 1990. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

CHO, S.; WOOD, A.; BOWLBY, M. R. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. **Curr Neuropharmacol**, v. 5, n. 1, p. 19-33, Mar 2007. ISSN 1570-159X (Print)

1570-159x.

CLARK, D. A. et al. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**, v. 26, n. 28, p. 7444-51, Jul 12 2006. ISSN 0270-6474.

CONDORELLI, D. F. et al. Effect of trophic factors, released after hippocampal injury, on astroglial cell proliferation. **Metab Brain Dis**, v. 4, n. 1, p. 41-6, Mar 1989. ISSN 0885-7490 (Print)

0885-7490.

CONDORELLI, D. F. et al. Glial fibrillary acidic protein messenger RNA and glutamine synthetase activity after nervous system injury. **J Neurosci Res**, v. 26, n. 2, p. 251-7, Jun 1990. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012.

COOKSON, M. R. et al. Use of astrocytes for in vitro neurotoxicity testing. **Toxicol In Vitro**, v. 8, n. 4, p. 817-9, Aug 1994. ISSN 0887-2333 (Print)

0887-2333.

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicol In Vitro**, v. 8, n. 3, p. 351-9, Jun 1994. ISSN 0887-2333 (Print)

0887-2333.

COSTA, S. L. et al. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. **Neurotox Res**, v. 30, n. 1, p. 41-52, Jul 2016. ISSN 1029-8428.

DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1026s-31s, Apr 2000. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 9, p. 1163-70, Sep 1998. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879x.

DIVITO, C. B.; UNDERHILL, S. M. Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. **Neurochem Int**, v. 73, p. 172-80, Jul 2014. ISSN 0197-0186.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 4, p. 379-87, Apr 2009. ISSN 1671-4083.

DRINGEN, R. et al. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. **Neurochem Res**, v. 40, n. 12, p. 2570-82, Dec 2015. ISSN 0364-3190.

ENGELHART, M. J. et al. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. **Jama**, v. 287, n. 24, p. 3223-9, Jun 26 2002. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484.

ESTRADA-SANCHEZ, A. M.; REBEC, G. V. Role of cerebral cortex in the neuropathology of Huntington's disease. **Front Neural Circuits**, v. 7, p. 19, 2013. ISSN 1662-5110.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 556-62, Oct 18 2002. ISSN 0036-8075.

FORAN, E.; TROTTI, D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 7, p. 1587-602, Jul 2009. ISSN 1523-0864.

FRAGA, C. G. et al. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 5, p. 717-20, Mar 1 1987. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952.

FREITAS, S. et al. Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells. **Phytother Res**, v. 25, n. 6, p. 916-21, Jun 2011. ISSN 0951-418x.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chem Biol Interact**, v. 163, n. 1-2, p. 4-14, Oct 27 2006. ISSN 0009-2797 (Print)

0009-2797.

GOMES, F. C.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 5, p. 619-31, May 1999. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879x.

GREENAMYRE, J. T.; PORTER, R. H. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. **Neurology**, v. 44, n. 11 Suppl 8, p. S7-13, Nov 1994. ISSN 0028-3878 (Print)

0028-3878.

GRIFFITH, H. R. et al. Reduced brain glutamate in patients with Parkinson's disease. **NMR Biomed**, v. 21, n. 4, p. 381-7, May 2008. ISSN 0952-3480 (Print)

0952-3480.

GRYGLEWSKI, R. J. et al. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 3, p. 317-22, Feb 1 1987. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952.

HACKETT, A. M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. **Prog Clin Biol Res**, v. 213, p. 177-94, 1986. ISSN 0361-7742 (Print)

0361-7742.

HALL, A.; GIESE, N. A.; RICHARDSON, W. D. Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. **Development**, v. 122, n. 12, p. 4085-94, Dec 1996. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic Biol Med**, v. 16, n. 6, p. 845-50, Jun 1994. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

HAO, G. et al. Rutin Inhibits Neuroinflammation and Provides Neuroprotection in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage, Possibly Through Suppressing the RAGE-NF-kappaB Inflammatory Signaling Pathway. **Neurochem Res**, v. 41, n. 6, p. 1496-504, Jun 2016. ISSN 0364-3190.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, Nov 2000. ISSN 0031-9422 (Print)

0031-9422.

HARRIS, M. E. et al. beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 6, n. 14, p. 1875-9, Oct 2 1995. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965.

HARRIS, M. E. et al. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. **J Neurochem**, v. 67, n. 1, p. 277-86, Jul 1996. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

HERCULANO-HOUZEL, S.; LENT, R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2518-21, Mar 9 2005. ISSN 0270-6474.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review†. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 11, n. 5, p. 433-448, 1976. ISSN 1365-2621. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00743.x> >.

HERTOG, M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p. 1007-11, Oct 23 1993. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736.

HERTOG, M. G. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutr Cancer**, v. 20, n. 1, p. 21-9, 1993. ISSN 0163-5581 (Print)

0163-5581.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem Biol Interact**, v. 139, n. 1, p. 1-21, Jan 22 2002. ISSN 0009-2797 (Print)

0009-2797.

HOPPE, J. B. et al. Curcumin protects organotypic hippocampal slice cultures from Abeta1-42-induced synaptic toxicity. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 8, p. 2325-30, Dec 2013. ISSN 0887-2333.

HUGHES, J. B. et al. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 43, p. 50–58, Dec 2006.

HUMPEL, C. Organotypic brain slice cultures: A review. **Neuroscience**, v. 305, p. 86-98, Oct 1 2015. ISSN 0306-4522.

HYMAN, C. et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, v. 350, n. 6315, p. 230-2, Mar 21 1991. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

JANSSEN, C. I. et al. Effect of perinatally supplemented flavonoids on brain structure, circulation, cognition, and metabolism in C57BL/6J mice. **Neurochem Int**, v. 89, p. 157-69, Oct 2015. ISSN 0197-0186.

JEAN, S. M. et al. Cerebrovascular accident (stroke) in captive, group-housed, female chimpanzees. **Comp Med**, v. 62, n. 4, p. 322-9, Aug 2012. ISSN 1532-0820 (Print)

1532-0820.

JU, W. K. et al. Memantine blocks mitochondrial OPA1 and cytochrome c release and subsequent apoptotic cell death in glaucomatous retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 2, p. 707-16, Feb 2009. ISSN 0146-0404.

KANDEL, E. R. Nerve cells and behavior. In: KANDEL E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (eds) Principles of neural science. **McGraw-Hill**, New York, pp 19–35, 2000.

KIM, B. J. et al. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. **Int J Cosmet Sci**, v. 19, n. 6, p. 299-307, Dec 1997. ISSN 0142-5463 (Print)

0142-5463.

KIM, K. et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 10, p. 2484-93, Oct 2011. ISSN 0021-9541.

KIRCHHOFF, F.; DRINGEN, R.; GIAUME, C. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 251, n. 4, p. 159-69, Aug 2001. ISSN 0940-1334 (Print)

0940-1334.

KO, F. N. et al. Isoorientin-6"-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1389, n. 2, p. 81-90, Jan 15 1998. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009. ISSN 0891-5849.

KRITIS, A. A. et al. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 91, 2015. ISSN 1662-5102.

KRIZKOVA, J. et al. The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine. **Interdiscip Toxicol**, v. 2, n. 3, p. 201-4, Sep 2009. ISSN 1337-6853.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013. ISSN 1537-744x.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v. 115, p. 157-88, Apr 2014. ISSN 0301-0082.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055-66, Jun 13 2009. ISSN 0140-6736.

LI, C.; BEAL, M. F. Leucine-rich repeat kinase 2: a new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 46, p. 16535-6, Nov 15 2005. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

LIOT, G. et al. Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. **Biochem Biophys Res Commun**, Sep 14 2016. ISSN 0006-291x.

LIU, R. R.; MURPHY, T. H. Reversible cyclosporin A-sensitive mitochondrial depolarization occurs within minutes of stroke onset in mouse somatosensory cortex in vivo: a two-photon imaging study. **J Biol Chem**, v. 284, n. 52, p. 36109-17, Dec 25 2009. ISSN 0021-9258.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 399-415, May 2003. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003x.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

MANACH, C. et al. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 11-12, p. 1259-66, Dec 1999. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

MARTIN, L. J. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 3, n. 4, p. 839-915, 2010. ISSN 1424-8247 (Print)

1424-8247.

MASSANO, J.; BHATIA, K. P. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 6, p. a008870, Jun 2012. ISSN 2157-1422.

MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. Red wine and antioxidant activity in serum. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.344, 1994. p.193-4. ISBN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking).

MCBAIN, C. J.; FISAHN, A. Interneurons unbound. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 1, p. 11-23, Jan 2001. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003x.

MEAD, C.; PENTREATH, V. W. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 12, n. 2, p. 141-52, Apr 1998. ISSN 0887-2333 (Print)

0887-2333.

MIDDLETON, E., JR.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochem Pharmacol**, v. 43, n. 6, p. 1167-79, Mar 17 1992. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952.

MOLYNEAUX, B. J. et al. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 427-37, Jun 2007. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003x.

MORA, A. et al. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 40, n. 4, p. 793-7, Aug 15 1990. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-98, Jul 29 2010. ISSN 0896-6273.

NAKASE, T.; NAUS, C. C. Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 149-58, Mar 23 2004. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

NEIVA, T. J. et al. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. **Phytother Res**, v. 13, n. 7, p. 597-600, Nov 1999. ISSN 0951-418X (Print)

0951-418x.

NISHIYAMA, A.; CHANG, A.; TRAPP, B. D. NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 58, n. 11, p. 1113-24, Nov 1999. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069.

NUNEZ-FIGUEREDO, Y. et al. JM-20, a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule, protects mitochondria and prevents ischemic insult-mediated neural cell death in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 726, p. 57-65, Mar 5 2014. ISSN 0014-2999.

OHSHIMA, H. et al. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 9, p. 1057-65, Dec 1998. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-21, May 9 1969. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075.

PARDO-ANDREU, G. L. et al. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 253, n. 3, p. 282-9, Jun 15 2011. ISSN 0041-008x.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat brain: in Stereotaxic Coordinates. **Elsevier**, 6. ed., 2007.

PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 423-36, Jun 2008. ISSN 1471-003x.

PIWONSKA, M. et al. Effectors of large-conductance calcium-activated potassium channel modulate glutamate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 76, n. 1, p. 20-31, 2016. ISSN 0065-1400.

PORTA, S. et al. RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 9, p. 1039-50, May 1 2007. ISSN 0964-6906 (Print)

0964-6906.

PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R. J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 9673-6, Mar 12 2004. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

QUINTANILLA, R. A.; TAPIA, C.; PEREZ, M. J. Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease. **Biochem Biophys Res Commun**, Sep 13 2016. ISSN 0006-291x.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochem Med Metab Biol**, v. 39, n. 1, p. 69-79, Feb 1988. ISSN 0885-4505 (Print)

0885-4505.

REITH, M. E. A. From First to Fourth Messengers in the Brain. In: REITH, M. E. A. (Ed.). **Cerebral Signal Transduction: From First to Fourth Messengers**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p.3-23. ISBN 978-1-59259-019-3.

RICE-EVANS, C.; MILLE, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

RODRIGUES, A. M. et al. Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. **Brain Res**, v. 1503, p. 53-61, Mar 29 2013. ISSN 0006-8993.

RODRIGUEZ, M. C.; OBESO, J. A.; OLANOW, C. W. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S175-88, Sep 1998. ISSN 0364-5134 (Print)

0364-5134.

ROTHMAN, S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. **J Neurosci**, v. 4, n. 7, p. 1884-91, Jul 1984. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474.

SANDBERG, M.; WARD, H. K.; BRADFORD, H. F. Effect of cortico-striate pathway lesion on the activities of enzymes involved in synthesis and metabolism of amino acid neurotransmitters in the striatum. **J Neurochem**, v. 44, n. 1, p. 42-7, Jan 1985. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

SCHINDER, A. F. et al. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 16, n. 19, p. 6125-33, Oct 1 1996. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474.

SCHOUSBOE, A. et al. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. **Adv Neurobiol**, v. 11, p. 13-30, 2014. ISSN 2190-5215 (Print).

SCHULZ, J. B. et al. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. **Mol Cell Biochem**, v. 174, n. 1-2, p. 193-7, Sep 1997. ISSN 0300-8177 (Print)

0300-8177.

SERAFINI, M.; GHISELLI, A.; FERRO-LUZZI, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. **Eur J Clin Nutr**, v. 50, n. 1, p. 28-32, Jan 1996. ISSN 0954-3007 (Print)

0954-3007.

SIEGEL, D.J. Relationships and the developing mind. **Childcare Information Exchange**, 48-51, 1999.

SILVA, A. et al. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p. 75–86, 2008.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 0001-6322.

SOHOLM, B. Clinical improvement of memory and other cognitive functions by Ginkgo biloba: review of relevant literature. **Adv Ther**, v. 15, n. 1, p. 54-65, Jan-Feb 1998. ISSN 0741-238X (Print)

0741-238x.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychol Rev**, v. 20, n. 4, p. 327-48, Dec 2010. ISSN 1040-7308.

STOPPINI, L.; BUCHS, P. A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods**, v. 37, n. 2, p. 173-82, Apr 1991. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270.

SUGIHARA, N. et al. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 11-12, p. 1313-23, Dec 1999. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849.

SWANSON, R. A.; YING, W.; KAUPPINEN, T. M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. **Curr Mol Med**, v. 4, n. 2, p. 193-205, Mar 2004. ISSN 1566-5240 (Print)

1566-5240.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth. **An Acad Bras Cienc**, v. 74, n. 4, p. 683-90, Dec 2002. ISSN 0001-3765 (Print)

0001-3765.

TERAHARA, N. Flavonoids in foods: a review. **Nat Prod Commun**, v. 10, n. 3, p. 521-8, Mar 2015. ISSN 1934-578X (Print)

1555-9475.

TERAO, J.; PISKULA, M.; YAO, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, n. 1, p. 278-84, Jan 1994. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

TZENG, S. H. et al. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb Res**, v. 64, n. 1, p. 91-100, Oct 1 1991. ISSN 0049-3848 (Print)

0049-3848.

VERCESI, A. E. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. **Biosci Rep**, v. 21, n. 2, p. 195-200, Apr 2001. ISSN 0144-8463 (Print)

0144-8463.

VINSON, J. A. et al. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2800-2802, 1995/11/01 1995. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf00059a005>>.

VOTYAKOVA, T. V.; REYNOLDS, I. J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J Neurochem**, v. 79, n. 2, p. 266-77, Oct 2001. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

WANG, R.; REDDY, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, Sep 23 2016. ISSN 1387-2877.

WANG, X.; ZHU, G. [Study on protective effect of salvianolic acid B on glutamate-induced excitotoxicity in pheochromocytoma PC12 cells]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 37, n. 3, p. 353-7, Feb 2012. ISSN 1001-5302 (Print)

1001-5302.

WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, n. 11, p. 1382-402, Nov 2010. ISSN 1360-8185.

WEINREB, O. et al. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem**, v. 15, n. 9, p. 506-16, Sep 2004. ISSN 0955-2863 (Print)

0955-2863.

WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. **J Neurosci**, v. 16, n. 18, p. 5688-97, Sep 15 1996. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474.

WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. **J Physiol**, v. 498 (Pt 1), p. 31-47, Jan 1 1997b. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751.

WHITTEMORE, E. R. et al. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. **Neuroscience**, v. 67, n. 4, p. 921-32, Aug 1995. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. **Adv Neurol**, v. 60, p. 53-61, 1993. ISSN 0091-3952 (Print)

0091-3952.

WU, Y. J. et al. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 3, p. 481-6, Mar 1998. ISSN 1079-5642 (Print)

1079-5642.

XING, C. et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. **Int J Stroke**, v. 7, n. 5, p. 378-85, Jul 2012. ISSN 1747-4930.

YOKOZAWA, T. et al. Effects of Japanese black tea on atherosclerotic disorders. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 62, n. 1, p. 44-8, Jan 1998. ISSN 0916-8451 (Print)

0916-8451.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranine as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 201, n. 1, p. 255-65, Apr 15 1980. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

ZHANG, Y. et al. Recent Advance in the Relationship between Excitatory Amino Acid Transporters and Parkinson's Disease. **Neural Plast**, v. 2016, p. 8941327, 2016. ISSN 1687-5443.

ZHU, X. et al. Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. **Development**, v. 138, n. 4, p. 745-53, Feb 2011. ISSN 0950-1991.

ZIOBRO, J. M.; DESHPANDE, L. S.; DELORENZO, R. J. An organotypic hippocampal slice culture model of excitotoxic injury induced spontaneous recurrent epileptiform discharges. **Brain Res**, v. 1371, p. 110-20, Jan 31 2011. ISSN 0006-8993.