



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



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

NAIARA SILVA DOURADO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DA APIGENINA EM MODELOS *IN
VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO**

Salvador, BA
2017

NAIARA SILVA DOURADO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DA APIGENINA EM MODELOS *IN
VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silva Lima Costa
Co-orientador: Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva

Salvador, BA
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Dourado, Naiara Silva
Investigação da atividade neuroprotetora e anti-inflamatória da apigenina em modelos in vitro de neuroinflamação / Naiara Silva Dourado. -- Salvador- BA, 2017.
93 f. : il

Orientadora: Silvia Lima Costa.
Coorientador: Victor Diógenes Amaral Silva.
Dissertação (Mestrado - Imunologia) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

1. Neuroinflamação. 2. Doença de Alzheimer. 3. Neuroproteção. 4. Anti-inflamatório. 5. Flavonoide. I. Costa, Silvia Lima. II. Silva, Victor Diógenes Amaral . III. Título.

NAIARA SILVA DOURADO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
APIGENINA EM MODELOS *IN VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO**

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

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva _____
Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia (2012).
Professor Adjunto da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Prof^a. Dra. Luciana Souza de Aragão França _____
Doutorado em Biotecnologia pela Fundação Oswaldo Cruz (2014).
Pesquisadora e citometrista no Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - Hospital São Rafael (HSR).

Prof. Dr. Vitor Antônio Fortuna _____
Doutorado em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2002).
Professor Associado II da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

“Abrirei rios em lugares altos e fontes no meio dos vales; Tornarei o deserto em lagos e a terra seca em mananciais.” Isaias 41:18.

Ao meu querido Avô, José Augusto (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Adenaide, minha vida, pelo cuidado incansável e amor incondicional, por ser um exemplo de ser humano e por semear em mim sementes de alegria, paz, justiça e esperança, mostrando-me sempre o melhor da vida. Ao seu lado tudo fica mais leve.

Ao meu pai Edinaldo, por passar valores inestimáveis, por me conceder a oportunidade de crescer profissionalmente, pelo amor e incentivo sempre.

À minha família, pelo amor sem medidas, pelos abraços à distância e pelas orações que sempre me fizeram tão bem.

Ao meu Amor Alexandre, presente divino, pelo cuidado, amizade, companhia, pela paciência, amor, abraços e por segurar lágrimas e fazer brotar os melhores sorrisos. Te amo!

À Prof^a Silvia, exemplo de garra e coragem. Primeiramente por ter me acolhido como estudante e filha na pesquisa, pela sua orientação, disposição para ajudar sempre, por acreditar e confiar em mim, pelos ensinamentos sempre valiosos. Grata por esses dois anos de crescimento pessoal e profissional, pelo carinho, preocupação e amizade. Você é um exemplo de mulher na pesquisa, obrigada.

À Keu, co-orientadora, uma amiga que levarei para a vida. Agradeço por sua orientação, confiança, paciência, por todo conhecimento transmitido e pelo prazer em ensinar com perfeição. Pesquisadora nata, agradeço por todas as vezes que me fez refletir, pelo carinho, por me passar ensinamentos muito além da pesquisa, me passou valores de vida grandiosos. Keu, você é um ser humano sensacional.

Ao Professor Victor, primeiramente por aceitar o convite para substituir a minha orientadora, por me orientar tão bem, por todo conhecimento transmitido durante o mestrado, pela paciência, pela disposição para ajudar sempre e por ser tão altruísta. Devo minha gratidão a você. Obrigada por tudo, você tem um coração lindo.

À minha amiga-irmã-mãe Monique, presente de Deus, foram dois anos vividos que valeram por dez. Meu eterno agradecimento, por não só fazer parte da minha pesquisa, mas da minha vida. Os agradecimentos não caberiam aqui, mas cabem no meu coração. Obrigada por TUDO, hoje sou uma pessoa melhor e sem você esses dois anos não teriam a mesma energia, pois amizade é quase tudo. Você é simplesmente, Monique.

Aos meus dois queridos amigos Rafael e Fillipe, obrigada pelo cuidado com irmã mais nova, pelas conversas, por “quebrar-galhos”, pelos conselhos, pelas “trolagens”, pela atenção, risadas, carinho e pela amizade preciosa que levarei por toda a vida. Amo vocês.

Às amigas Alessandra e Julita, exemplo de mães, esposas e pesquisadoras. Obrigada por tudo, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela amizade.

Ao querido mestre, Ramon El-Bachá, dois anos de muito conhecimento transmitido, sou muito grata!

Aos queridos ICs Jana, Ícaro e Jéssica primeiramente pela amizade, pela convivência diária no lab, pela ajuda incrível, sou grata de coração, sem vocês não daria.

Aos meus queridos amigos BFs do LABNq por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas risadas, pelas “trolagens” que só eu caio. Pelos abraços, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade. De fato, é impossível fazer pesquisa sozinho, hoje somos uma família. Cada um tem um lugar no meu coração.

À Lúcia, Seu Carlos e Verônica, o LABNq funciona muito melhor com vocês. Obrigada por tudo!

As meninas do PPGIM, queridas, pela paciência e carinho.

Aos meus amigos queridos Marllus, Cris, Tamires, Iara, Humberto, Beca, André e Bruno por estarem por perto, pela paciência, compreensão, pela ajuda e carinho.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo acúmulo de proteína β amiloide ($A\beta$) e aumento da resposta inflamatória mediada por microglia e astrócitos, que uma vez ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias, como $IL1\beta$, favorecendo a neurodegeneração. Este estudo avaliou o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório do flavonoide apigenina em modelos *in vitro* de neuroinflamação induzida por LPS, $IL1\beta$ ou $A\beta$. Co-culturas de células gliais e neurônios, cultivadas a partir do córtex de ratos Wistar, foram expostas durante 24 h ao LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) ou $IL1\beta$ (10 ng/mL), ou durante 4 h aos oligômeros $A\beta$ (500 nM) e então tratadas com apigenina (1 μM) por 24 h. Observou-se através de marcação com Fluoro Jade B e caspase 3, que a apigenina não foi neurotóxica e apresenta efeito neuroprotetor frente ao dano inflamatório. A análise por imunocitoquímica revelou que a apigenina reduziu a ativação inflamatória e proliferação microglial, através da redução dos marcadores CD68 e BrdU, respectivamente, assim como favoreceu a preservação da integridade de neurônios e astrócitos e modulou o padrão morfológico microglial, determinado pelos marcadores β tubulina III, GFAP e Iba1, respectivamente. O efeito imunomodulador da apigenina, avaliado por qRT-PCR demonstrou que a apigenina não induziu alterações na expressão de IL-6, IL-1 β e CCL5, porém induziu aumento da expressão de BDNF. O dano com IL-1 β induziu aumento nos níveis de IL-6, IL-1 β e CCL5, e diminuição na expressão de IL10 e BDNF. Entretanto, após indução de dano, a apigenina induziu redução da expressão de IL-6 e CCL5 e aumento dos níveis de IL-10 e BDNF. Estes dados sugerem que a apigenina tem potencial neuroprotetor e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Neuroinflamação; Doença de Alzheimer; Neuroproteção; Anti-inflamatório; Flavonoide.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is characterized by accumulation of the β amyloid protein ($A\beta$) and increase of inflammatory response mediated by microglia and astrocytes, which once activated, release pro-inflammatory cytokines such as IL1 β , resulting in neurodegeneration. This study evaluated the neuroprotective and anti-inflammatory potential of flavonoid apigenin *in vitro* models of neuroinflammation induced by LPS, IL1 β or $A\beta$. Co-cultures of neurons and glial cells were cultivated from the cortex of Wistar rats. Cells were exposed for 24 h to LPS (1 μ g/mL) or IL1 β (10ng/mL) or for 4 h to oligomers $A\beta$ (500 nM) and then treated with apigenin (1 μ M) for more 24 h. It was observed by Fluoro Jade B and caspase 3 immunostaining that apigenin was not neurotoxic and has a neuroprotector effect against inflammatory damage. The immunofluorescence analysis revealed that apigenin reduced microglial inflammatory activation and proliferation through decrease of staining for CD68 and BrdU markers, respectively, and preserved neuronal and astrocytic of cellular integrity, also modulating the microglial morphological pattern, determined by staining for β tubulin III, GFAP and Iba1 proteins, respectively. The immunomodulatory effect of apigenin, evaluated by qPCR demonstrated that apigenin did not induce changes on expression of IL-6, IL-1 β and CCL5 and induced increase the expression of BDNF. IL-1 β damage induced increase in the levels of IL-1 β , IL-6, and CCL5, and decrease the expression the IL10 and BDNF. However, association of apigenin to IL- β induced decrease in the expression of IL-6 and CCL5 and increase the expression of IL-10 and BDNF. These data suggest that apigenin presents neuroprotective and anti-inflammatory potential.

Keywords: Neuroinflammation; Alzheimer Disease; Neuroprotection; Anti-inflammatory; Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interações neurônio-glia.....	22
Figura 2: Polarização do perfil microglial M1/M2 e funções imunoregulatórias.....	24
Figura 3: O processo neuroinflamatório.....	30
Figura 4: Estrutura química básica dos flavonoides.....	34
Figura 5: Estrutura da apigenina.....	36
Figura 6: Delineamento experimental.....	44
Figura 7: Efeito da apigenina na viabilidade neuronal.....	51
Figura 8: Análise do efeito neuroprotetor da apigenina por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por LPS.....	52
Figura 9: Análise do efeito neuroprotetor da apigenina por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β	54
Figura 10: Avaliação do perfil microglial por imunocitoquímica.....	56
Figura 11: Análise da morfologia microglial por imunocitoquímica.....	58
Figura 12: Avaliação da proliferação microglial por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por LPS.....	60
Figura 13: Avaliação da proliferação microglial por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por oligômeros A β	62
Figura 14: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida LPS.....	64
Figura 15: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β	65
Figura 16: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por oligômeros A β	66
Figura 17: Análise da expressão relativa de mediadores pró-inflamatórios e regulatórios por qRT-PCR.....	68
Figura 18: Análise da expressão relativa de neurotrofinas por qRT-PCR.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imunocitoquímica.	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Ativação Imune Materna
AChE	Acetilcolinesterase
API	Apigenina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
BHE	Barreira Hematoencefálica
BrdU	5'-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD36	Receptor scavenger classe B
CD68	Glicoproteína transmembranar lisossomal
CD206	Receptor manose 1 lectina tipo C
CD	Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
CCL5	Quimiocina ligante C-C 5
CCL2/MCP1	Motivo C-C ligante do tipo 2 (proteína quimiotática de monócitos 1)
COX2	Ciclooxigenase-2
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
CTPiH	Células Tronco Pluripotentes Induzidas Humanas
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ERK1/2	Quinase regulada pela sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FJB	Fluoro-Jade B
GABAA	Ácido Gama-aminobutírico do tipo A
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Glia
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLAST	Transportador de Glutamato/aspartato

GLT-1	Transportador de Glutamato 1
HCL	Ácido Clorídrico
HFIP	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol
HPRT	Hipoxantina Fosforribosil Transferese
IBA1	Proteína adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1
IFN γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IRF	Intensidade Relativa de Fluorescência
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MAPK	MAP quinase
MPP	Neurotoxina 1-metil-4-fenilpirídio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NG2	Proteoglicano nuclear
NLRP3	Receptor semelhante a NOD, contendo domínios pirina 3
NLR	Receptor Semelhante a NOD
NMDA	Receptores de N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOD	Domínio de Oligomerização Nucleotidea
NFT	Neurotrofina
NFT4	Neurotrofina 4
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PLC γ	Fosfolipase C
PPA	Proteína Precursora Amiloide
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RAS-ERK	Sinal extracelular regulado por cinase
RNA m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
S100 β	Protéina de ligação ao cálcio β

SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento β
TLR	Receptor Semelhante à Toll
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TrkB	Receptores Tirosina-quinase B
TrkC	Receptores Tirosina-quinase C
2xTg-DA	Duplo Transgênico para doença de Alzheimer
3xTg-DA	Triplo Transgênico para doença de Alzheimer
β A	β Amiloide
β tubulina III	Proteína β Tubulina III

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ENVOLVIDAS NA NEUROINFLAMAÇÃO	20
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	24
2.2.1 Neuroinflamação e resposta glial	27
2.2.2 Principais abordagens terapêuticas	30
2.3 FLAVONOIDES E O SNC	31
2.3.1 Apigenina	34
2.4 CO-CULTURA DE NEURÔNIO E GLIA COMO MODELO DE ESTUDO DAS DESORDENS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS A PROCESSOS NEUROINFLAMATÓRIOS	37
3 HIPÓTESE	39
4 OBJETIVOS:	39
4.1 OBJETIVO GERAL:	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	39
5 METODOLOGIA	40
5.1 CO-CULTURA DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS	40
5.2 TRATAMENTOS	41
5.2.1 Exposição ao lipopolissacarídeo (LPS)	41
5.2.2 Exposição à interleucina 1β (IL1β)	42
5.2.3 Solubilização e preparo de oligômeros do peptídeo β-amilóide	42
5.2.4 Exposição aos oligômeros Aβ	43
5.2.5 Tratamento com a apigenina	43
5.3 ANÁLISE DE DEGENERAÇÃO NEURONAL.....	44
5.4 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA	45
5.5 EXTRAÇÃO DE RNA E qRT-PCR	47
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6 RESULTADOS	50
6.1 O FLAVONOIDE APIGENINA PROTEGE CONTRA NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA A NEUROINFLAMAÇÃO.....	50

6.1.1 Apigenina protege contra neurodegeneração associada a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS)	50
6.1.2 Apigenina protege contra neurodegeneração associada a neuroinflamação induzida por interleucina 1β (IL1β)	53
6.2 A APIGENINA MODULA O PERFIL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL NA PRESENÇA DE ESTÍMULO INFLAMATÓRIO.	55
6.2.1 Apigenina modula o perfil de ativação microglial em modelo de neuroinflamação induzida por LPS	55
6.2.2 Apigenina modula o padrão morfológico microglial em modelo de neuroinflamação induzida por IL1β	57
6.3 APIGENINA REDUZ PROLIFERAÇÃO MICROGLIAL ASSOCIADA A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS E POR OLIGÔMEROS DE Aβ.....	59
6.4 APIGENINA PRESERVA A MORFOLOGIA NEURONAL E ASTROCITÁRIA E RESTABELECE O PERFIL MORFOLÓGICO APÓS ESTÍMULO INFLAMATÓRIO.	63
6.4.1 A apigenina preserva a morfologia de neurônios e astrócitos em modelos de neuroinflamação induzida por LPS, IL-1β e oligômeros Aβ.....	63
6.5 O FLAVONOIDE APIGENINA APRESENTA POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO.....	66
6.5.1 Perfil de expressão de neurotrofinas em co-culturas de neurônios e células gliais em um modelo de neuroinflamação induzida por IL1β.....	68
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios neurodegenerativos são considerados um grave problema de saúde pública que afeta o envelhecimento populacional. A neurodegeneração está associada à perda de neurônios no cérebro ou medula espinhal. Apesar das novas abordagens terapêuticas desenvolvidas ao longo dos últimos anos, os tratamentos contra as desordens neurodegenerativas ainda são limitados e as abordagens convencionais tratam principalmente os sintomas (CAPRNDA *et al.*, 2017).

À medida que a população em geral envelhece progressivamente, a prevalência de distúrbios neurodegenerativos continua a aumentar. O envelhecimento cerebral é acompanhado de alterações metabólicas, morfológicas e mudanças neurofisiológicas, muitas vezes associadas a uma deficiência na aprendizagem e memória com consequente perda de sinapses (PROCACCINI *et al.*, 2016).

Os distúrbios neurodegenerativos estão geralmente associados à deposição dependente da idade de proteínas agregadas e mal enoveladas, que cursam com distúrbios cognitivos, disfunção locomotora e perda neuronal. Muitos estudos demonstram que as doenças neurodegenerativas têm um fenótipo inflamatório dominante, e o papel da neuroinflamação e ativação imune no SNC nos estágios iniciais da doença. Não obstante, a população de macrófagos residentes no SNC, a microglia, é a uma classe de células que está presente de forma ativa em quase todos os distúrbios neurodegenerativos. Além da microglia, astrócitos ativados e monócitos ou linfócitos periféricos podem ser detectados no SNC afetado (DOTY *et al.*, 2015)

Vários estressores fisiológicos e celulares, incluindo o envelhecimento e a hipóxia, podem "estimular" a exacerbação da neuroinflamação pela microglia e incitar o dano neurotóxico (PIIRAINEN *et al.*, 2017). Embora a ativação de células microgliais seja uma resposta importante contra praticamente todos os insultos do SNC, a ativação crônica da microglia, como ocorre em praticamente todas as doenças neurodegenerativas, poderia eventualmente levar a lesões neuronais devido à produção persistente de mediadores inflamatórios tóxicos como citocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (VAN HORSSSEN *et al.*, 2017).

A doença de Alzheimer (DA), a mais frequente desordem neurodegenerativa no mundo, é caracterizada pelo acúmulo de proteína β -amilóide (A β) no parênquima cerebral, formação de emaranhados neurofibrilares, ativação glial e consequente

produção de mediadores inflamatórios como NO e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que eventualmente contribuem para toxicidade neuronal (SUTINEN *et al.*, 2012; ZOTOVA *et al.*, 2013). Apesar dos medicamentos comercializados auxiliarem na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, ainda não existe um tratamento efetivo que atue de forma a retardar a progressão da doença (COLOVIC *et al.*, 2013)

Os flavonoides, compostos derivados do metabolismo secundário das plantas, estão amplamente distribuídos no reino vegetal (AGATI *et al.*, 2011). Vários efeitos biológicos são atribuídos a este grupo de substâncias, bem como atividades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias (COELHO, P. L. C. *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; SROKA *et al.*, 2015)

A apigenina (4,5,7 – trihidroxiflavona) é um flavonoide da classe das flavonas (PATEL *et al.*, 2007). Dentre as suas atividades biológicas, encontram-se atividades antioxidante (HAN *et al.*, 2012), antitumoral (COELHO, P. L. *et al.*, 2016), próestrogênica (SOUZA *et al.*, 2015), anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2015) e neuroprotetora (BALEZ *et al.*, 2016).

Neste contexto, a apigenina, por apresentar propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapóptóticas e imunomoduladoras, pode ser uma alternativa como agente terapêutico para processos oxidativos e inflamatórios do SNC, em especial os envolvidos na DA. Embora estudos *in vivo* tenham sido desenvolvidos, o papel da apigenina no modelo *in vitro* de neuroinflamação induzida por IL1 β , correlacionando com a DA, ainda não está bem estabelecido. Por isso a investigação de possíveis fármacos neuroprotetores cujo mecanismo de ação baseie-se em atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapóptóticas e imunomoduladoras constituem-se provavelmente como importantes estratégias objetivando-se o estabelecimento de terapêuticas para processos neurodegenerativos como a DA. Assim, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor e anti-inflamatório da apigenina frente a diferentes estímulos inflamatórios em co-cultura de neurônios e células gliais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ENVOLVIDAS NA NEUROINFLAMAÇÃO .

As interações entre neurônios e células gliais são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso. Elas contribuem para a formação e função da Barreira Hematoencefálica (BHE), proliferação e migração neuronal, diferenciação celular, orientação axonal, formação e adaptação de redes neurais. Baseado na morfologia, função e localização no sistema nervoso central (SNC), existem vários tipos de células gliais, como os astrócitos, células NG2, oligodendrócitos e microglias (ALLEN & BARRES, 2009; BANERJEE & BHAT, 2007; NADKARNI *et al.*, 2008).

Os astrócitos, assim denominados pela morfologia estrelada, são responsáveis pela homeostasia do SNC, através da manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular e pela regulação do metabolismo do neurotransmissor excitatório glutamato (SCHOUSBOE *et al.*, 2014). São responsáveis pela detoxificação cerebral dependente de glutathione (DRINGEN *et al.*, 2015) e pela nutrição, por absorver glicose dos vasos sanguíneos e fornecer metabólitos energéticos para os neurônios (SOFRONIEW & VINTERS, 2010). Ademais, são integrantes das sinapses tripartites, capazes de modular as atividades neuronais (COMBES *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013). Embora os astrócitos possuam papel protetor no SNC, um outro fenótipo é comumente encontrado nas desordens neurodegenerativas, o qual é caracterizado pela proliferação, aumento em número e tamanho dos prolongamentos que se estendem a partir do soma, aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e produção de mediadores próinflamatórios como TNF- α , IL-1 β e espécies reativas, estado denominado astrogliose reativa (SOFRONIEW & VINTERS, 2010).

As células NG2, assim nomeadas por expressarem o proteoglicano NG2, caracterizam-se por serem progenitoras de oligodendrócitos (BUTT *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1996; NISHIYAMA *et al.*, 1999). Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação da bainha de mielina dos axônios neuronais, possibilitando maior eficiência e rapidez na condução do impulso nervoso (BRADL & LASSMANN, 2010; FUNFSCHILLING *et al.*, 2012; SIMONS & NAVE, 2015).

As microglias representam as células imunoefetoras do SNC, as quais possuem atividades semelhantes às dos macrófagos em outros órgãos, incluindo a apresentação de antígenos, fagocitose e indução à inflamação, constituindo, dessa maneira, a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos e danos no SNC (ALOISI, 2001). Essas células podem suprimir a inflamação através do aumento da expressão de citocinas regulatórias como interleucina 10 (IL10) e fator de crescimento transformador β (TGF- β), além de contribuir para neurogênese, através da produção de fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1), capaz de inibir a apoptose e aumentar a proliferação e diferenciação de células tronco neurais (ALOISI, 2001; DE LUCIA *et al.*, 2016; NAYAK *et al.*, 2014; THORED *et al.*, 2009; TSUNEKAWA *et al.*, 2017; VILHARDT, 2005; WAKE *et al.*, 2011) (Figura 1).

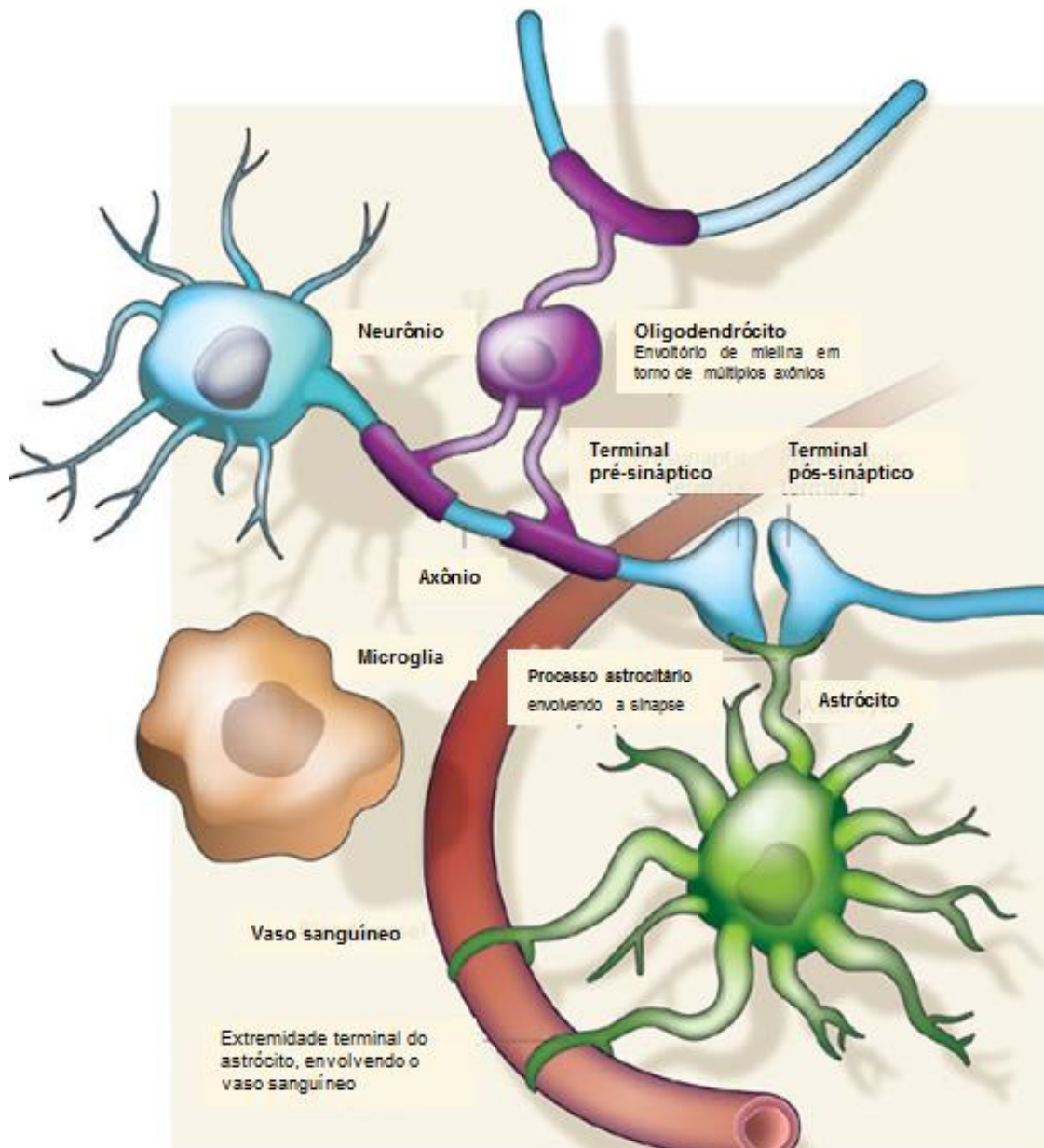


Figura 1: Interações neurônio-glia.

Diferentes tipos de células gliais interagem com neurônios e vasos sanguíneos adjacentes. Os astrócitos estendem processos que envolvem os vasos sanguíneos e as sinapses, sendo responsáveis pela formação da BHE e detoxificação do excedente de neurotransmissores acumulados nas fendas sinápticas. Os oligodendrócitos são responsáveis pela produção de mielina, envolvem os axônios do SNC a fim de acelerar a condução do impulso nervoso. As microglias atuam como células imunoefetoras do SNC e contribuem para a sobrevivência neuronal.

Fonte: Adaptado de ALLEN & BARRES (2009).

O perfil de ativação microglial é usualmente classificado em perfil M1 (pro-inflamatório), caracterizado pelo aumento da expressão do marcador CD68 (glicoproteína transmembranar lisossomal) (BOCHE *et al.*, 2013), produção de

mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , EROs, NO, proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2/MCP1) (NAKAGAWA & CHIBA, 2015). Entretanto, no perfil de ativação alternativa M2 (anti-inflamatório/neuroprotetor) há aumento da expressão do marcador CD206 (receptor de reconhecimento de padrão: receptor manose 1 lectina tipo C), produção de citocinas regulatórias, expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e IGF-1 (NAKAGAWA & CHIBA, 2015). Além disso, há aumento da expressão da enzima arginase-1. Sabe-se que os produtos gerados do metabolismo da arginina, contribuem para o reparo tecidual. Ademais, a arginase-1 compete com a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelo mesmo substrato, levando a supressão de NO (TANG & LE, 2016). É importante salientar que o desequilíbrio entre os perfis M1/M2, tem um papel crucial na inflamação no SNC (CHEN *et al.*, 2017; NAKAGAWA & CHIBA, 2015; SHAN *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2017) (Figura 2).

A reatividade microglial é marcada pelo aumento do corpo celular, espessamento e retração dos processos citoplasmáticos, aumento da expressão da proteína adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1 (Iba-1), bem como aumento expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 α (IL-1 α), interferon γ (IFN γ) e TNF α (SZNEJDER-PACHOLEK *et al.*, 2017).

Embora a glia reativa possa desempenhar um papel protetor no SNC, a ativação sustentada exacerba o dano neuronal e acelera a progressão de doenças neurodegenerativas (ANSARI & SCHEFF, 2010; DIAS *et al.*, 2013; KEMPURAJ *et al.*, 2016; PARPURA *et al.*, 2012).

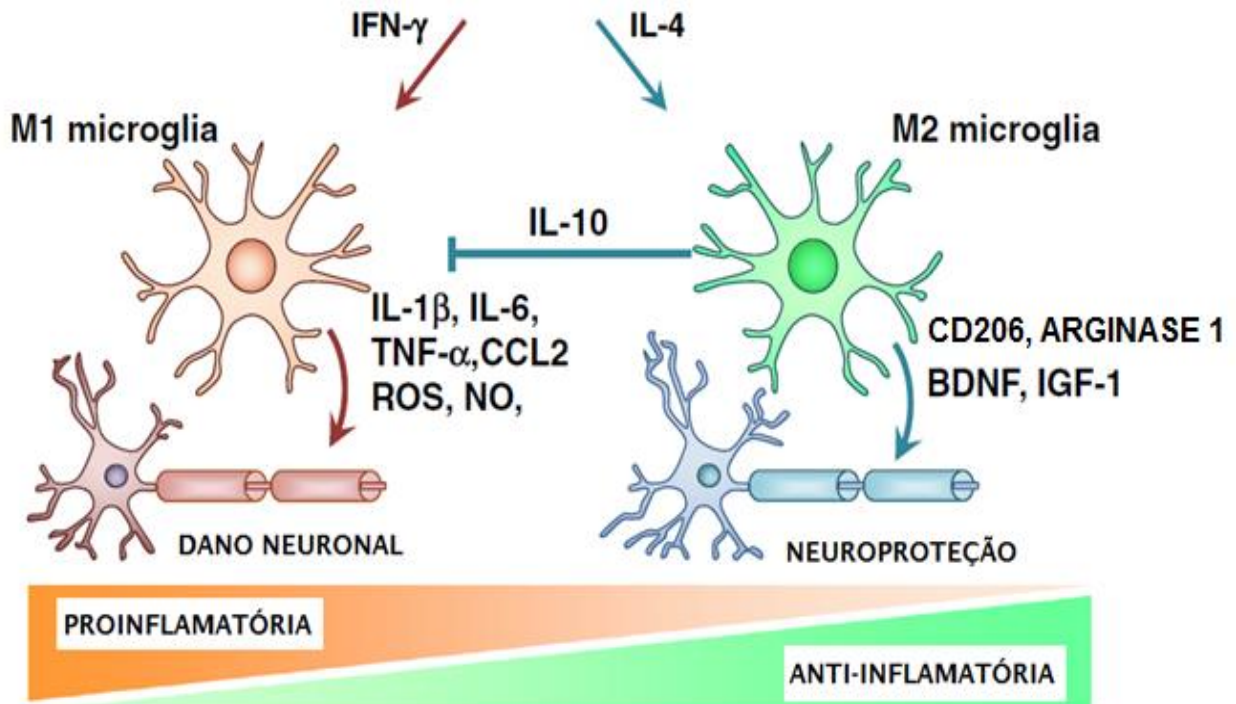


Figura 2: Polarização do perfil microglial M1/M2 e funções imunoregulatórias.

Na presença de estímulo inflamatório (IFN γ), as microglias polarizam para o perfil M1 e liberam mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, espécies reativas e NO, responsáveis pelo dano neuronal. Em contraste, na presença de citocinas regulatórias, a exemplo interleucina 4 (IL-4), polarizam para o perfil de ativação alternativa (M2) que regula negativamente as funções M1 através de citocinas regulatórias como IL-10. Ademais, a microglia com perfil M2 marcada pelo aumento da expressão de CD206 e Arginase 1, é capaz de remodelar o tecido através da produção de fatores neurotróficos IGF-1 e BDNF.

Fonte: Adaptado, NAKAGAWA & CHIBA, (2015).

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

O envelhecimento progressivo da população mundial em decorrência da melhoria na qualidade de vida tem causado um aumento da incidência e prevalência de doenças neurodegenerativas, sendo a doença de Alzheimer (DA) o subtipo de demência mais comum. Atualmente, estima-se haver cerca de 35,5 milhões de pessoas com demência no mundo e este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, chegando a 65,7 milhões em 2030 e a 115,4 milhões em 2050, segundo dados do relatório da Organização Mundial da Saúde (2012).

A doença foi originalmente descrita em 1906 por Alois Alzheimer, um neuropatologista alemão que, ao acompanhar um quadro de demência da paciente August Deter, que faleceu com danos cognitivos severos, observou, durante a autópsia, atrofia do córtex com alargamento dos sulcos, alterações histopatológicas como a presença de placas amiloides no parênquima cerebral, emaranhados neurofibrilares e anomalias vasculares, que caracterizaram a doença conhecida até então como pré-senil (SANABRIA-CASTRO *et al.*, 2017; SHAMPO *et al.*, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2011).

A DA é desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada por sintomas cognitivos e não cognitivos, que estão associados à atrofia cerebral. São comumente encontrados como principais aspectos clínicos, alterações das funções cognitivas, como a deficiência da memória recente, dificuldade de atenção e deficiência na linguagem. Além disso, são observados distúrbios comportamentais como depressão, agressividade e alucinações (SERENIKI & VITAL, 2008).

Em 1985, como consequência de estudos realizados por pesquisadores no intuito de caracterizar os constituintes das lesões na DA, (MASTERS *et al.*, 1985) identificaram a proteína β -amiloide ($A\beta$), isolada anteriormente a partir de depósitos ao redor de vasos sanguíneos meningeais de cérebro de paciente com síndrome de Down (GLENNER & WONG, 1984). Posteriormente, foi descoberto o gene que codificava esta proteína, demonstrando que esse peptídeo é derivado de uma proteína integral de membrana chamada de precursora amiloide (PPA), codificada no cromossomo 21 humano (DA ROCHA *et al.*, 2011).

Os fatores genéticos estão correlacionados a instalação e progressão da DA, os quais incluem mutações na PPA e na presenilina 1 e 2 (proteínas transmembrana que constituem a subunidade catalítica do complexo γ -secretase) (LANOISELEE *et al.*, 2017; WEGGEN & BEHER, 2012). Essa enfermidade também está associada à redução dos níveis de acetilcolina no processo sináptico, que culmina com a diminuição da neurotransmissão colinérgica cortical (VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2004). As sinapses colinérgicas são particularmente afetadas pela neurotoxicidade dos oligômeros $A\beta$, assim a perda sináptica está associada com o comprometimento cognitivo (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016). Recentemente demonstraram em modelo experimental de DA utilizando camundongos transgênicos (Tg2576) que superexpressam PPA humana mutada, disfunção do sistema dopaminérgico.

Sugerindo que a perda de neurônios dopaminérgicos também contribui para os déficits de memória (NOBILI *et al.*, 2017).

Histopatologicamente, a DA é caracterizada pela perda sináptica e morte neuronal na região do córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e no estriado ventral, regiões responsáveis pelas funções cognitivas (SELKOE, 2001). Sua fisiopatologia está associada à atrofia do córtex cerebral com acúmulo de peptídeo A β , que é derivado da clivagem proteolítica anormal da PPA, uma glicoproteína transmembrana encontrada em quase todas as células de mamíferos, inclusive presente em concentração elevada nos neurônios e parece estar envolvida na sinaptogênese, neuritogênese, na regulação da adesão, migração e sinalização neuronal (GRALLE & FERREIRA, 2007).

O processamento amiloidogênico da PPA é evento chave na patogênese da DA, que se inicia com a clivagem da PPA pela enzima β -secretase, sendo então formado um fragmento solúvel (sPPA β) e outro fragmento de 99 aminoácidos C terminal que fica retido na membrana (C-99). Posteriormente, o complexo enzimático γ -secretase cliva o peptídeo C99 originando o peptídeo A β na porção extracelular da membrana (ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, apesar da clivagem do A β ser um processo normal, em alguns indivíduos essa condição fisiológica parece estar modificada. Assim, uma vez liberado no meio extracelular, o A β tende a agregar de forma patológica. O tamanho desses agregados pode variar desde oligômeros solúveis até fibras insolúveis (SNYDER *et al.*, 1994).

Apesar das análises histopatológicas *post-mortem* de indivíduos portadores da DA revelarem acúmulo de placas amiloides (SABRI *et al.*, 2015), o declínio cognitivo de pacientes correlaciona-se melhor com os níveis de oligômeros A β no líquido cefalorraquidiano (SANTOS *et al.*, 2012). Essa observação neuropatológica apoia a noção de que os oligômeros são neurotóxicos mesmo na ausência de placas amiloides, além de serem responsáveis pela disfunção sináptica observada na DA (LOURENCO *et al.*, 2013; MUCKE *et al.*, 2000). Ademais, a disfunção sináptica e a morte neuronal parecem estar relacionadas à superestimulação de receptores excitatórios de N-metil-D-aspartato (NMDA) pelos oligômeros A β , com o aumento do influxo de cálcio citoplasmático que por sua vez desencadeia a ativação de vias associadas à hiperfosforilação da proteína tau, ativação de caspases, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (TU *et al.*, 2014).

Outras características patológicas são observadas na DA, como emaranhados neurofibrilares que são constituídos por filamentos de proteína tau hiperfosforilada, nesta condição apresentam mudanças conformacionais e perdem a função fisiológica de estabilização dos microtúbulos. A agregação patológica da proteína tau hiperfosforilada no interior dos neurônios leva a desorganização do citoesqueleto e alterações no transporte axonal, que afeta inclusive o transporte de mitocôndrias para as extremidades axonais, evento responsável pela degeneração distal em função da diminuição do metabolismo (KOLAROVA *et al.*, 2012). Além das características previamente citadas, existem evidências de que a ativação glial e a neuroinflamação são fatores comuns na patogênese dessa desordem (YIN *et al.*, 2017; ZOTOVA *et al.*, 2013).

2.2.1 Neuroinflamação e resposta glial

A neuroinflamação no SNC aparece como um evento central na fisiopatologia da DA. Recentemente Zhu e colaboradores (2017) evidenciaram em modelo de DA utilizando camundongos duplo transgênico para doença de Alzheimer (2xTg-DA), a relação direta entre o processo neuroinflamatório e o declínio cognitivo. Os mesmos autores observaram a presença de microglias ativadas no córtex e hipocampo desses animais e revelaram que essas células estavam intimamente associadas com as placas amilóides, sugerindo que a ativação microglial é um evento inicial em resposta ao A β .

A neurotoxicidade induzida pelos oligômeros de A β está associada a ativação microglial sustentada, que culmina com o aumento da produção de mediadores proinflamatórios como o NO (MAEZAWA *et al.*, 2011). Em análises do plasma de pacientes com DA foi observado elevados níveis de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-1 β e interleucina 18 (IL-18), evidenciando que a DA é acompanhada por uma resposta inflamatória (SWARDFAGER *et al.*, 2010). Em outro estudo utilizando linhagem de microglia BV2, pré-tratadas com TGF- β 1 e posteriormente expostas ao A β 25-35, foi demonstrado que o TGF- β 1 reduziu a quimiotaxia de microgliais para áreas com agregados de A β e que esse efeito envolve, pelo menos em parte a baixa regulação da CCL5 (HUANG *et al.*, 2010) (Figura 3).

O mecanismo pelo qual o A β solúvel inicia a resposta inflamatória mediada pela microglia, requer a ativação de inflamassoma NLRP3 (família NLR, contendo domínio pirina 3) (HALLE *et al.*, 2008). De início, a endocitose do A β via receptor scavenger classe B (CD36) pela microglia (GUILLOT-SESTIER & TOWN, 2013; SHEEDY *et al.*, 2013) provoca danos à membrana lisossomal e extravasamento da protease catepsina B para o citosol. Os produtos gerados pela atividade proteolítica da catepsina B podem ativar o complexo multiprotéico NLRP3, formado pelo receptor semelhante a NOD (NLR), pela proteína adaptadora associada a apoptose (ASC) e pela enzima efetora procaspase-1. O NLR é uma classe de receptor de reconhecimento de padrão citosólico que responde a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Quando esse receptor é estimulado, forma o complexo NLRP3 através da combinação com proteína ASC e isto estimula a autoclivagem da procaspase-1 na sua forma ativa, caspase-1. Posteriormente, a caspase-1 converte a pro-IL-1 β inativa na sua forma ativa, IL-1 β . A produção de pro-IL-1 β requer a ativação da via NF- κ B (fator nuclear κ B) mediada pelos receptores semelhante à Toll (TLR4/TLR6), vias importantes na propagação da resposta inflamatória (WALTER *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2016).

A endocitose do A β desencadeia a sinalização do complexo heterotrimérico CD36/TLR4/TLR6 em microglia, que resulta na transcrição da pró-IL1 β , ativação de inflamassoma e secreção de IL-1 β , NO e EROs, mediadores inflamatórios implicados nos efeitos neurotóxicos na DA (SHEEDY *et al.*, 2013; STEWART *et al.*, 2010). Ademias, o papel fundamental da inflamação mediada por NLRP3 e caspase-1 no declínio cognitivo e progressão da DA foi descrito por Heneka e colaboradores (2013), que utilizaram como modelo experimental camundongos 2xTg-DA com bloqueio da expressão dos genes NLRP3 ou caspase 1. Esses autores demonstraram que a deleção desses genes conferiu proteção contra os déficits de memória espacial e perda da plasticidade sináptica no hipocampo. Além disso, observaram modulação do perfil microglial, do fenótipo M1 para M2, redução da ativação de caspase-1 e da produção de IL1 β , demonstrando o mecanismo molecular comum subjacente à ativação da microglia e disfunção neuronal na DA.

Entre as citocinas inflamatórias associadas à DA, a IL-1 β tem sido implicada em desempenhar importante papel na progressão da DA. Kitazawa e colaboradores (2011) observaram em camundongos triplo transgênico para doença de Alzheimer (3xTg-DA) que receberam anticorpo bloqueador do receptor de IL-1 β via

intraperitoneal, redução da ativação de NF- κ B. Além disso, o bloqueio da sinalização de IL-1 β foi capaz de reduzir espécies de A β fibrilar e oligomérica no cérebro desses animais, reduzir os níveis de IL-1 β e TNF α e restaurar o déficits cognitivos. Os mesmo autores demonstraram que o bloqueio da sinalização de IL-1 β em astrócitos de camundongos 3xTg-AD suprimiu significativamente a produção de S100 β (protéina de ligação ao cálcio β). Estudo anterior, revelou em modelo experimental de DA utilizando camundongos transgênicos Tg2567, que a superexpressão da S100 β nesses animais favoreceu a progressão da DA, por induzir reatividade glial e produção citocinas proinflamatórias, além de exacerbar a amiloidose cerebral por promover o aumento da clivagem de PPA como consequência do aumento da atividade da enzima β -secretase (MORI *et al.*, 2010).

O processo neuroinflamatório na DA é caracterizado também pela ativação de astrócitos, segundo Carrero e colaboradores (2012) a injeção de formas oligoméricas de A β no córtex de ratos foi capaz de induzir ativação significativa de astrócitos, demonstrada pela ativação de NF- κ B e expressão de mediadores inflamatórios como TNF- α , Ciclooxigenase-2 (COX-2) e IL-1 β (Figura 3). Ademais, levando em consideração que a excitotoxicidade por glutamato está envolvida na patogênese da DA, Matos e colaboradores (2008) demonstraram que o A β 1-40 foi capaz de diminuir a expressão e atividade do transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e diminuir a captação de glutamato mediada pelo transportador de glutamato 1 (GLT-1) em cultura de astrócitos.

Em geral, estes eventos desencadeiam um ciclo vicioso que leva a neurodegeneração mediada por ativação glial e subsequente produção de mediadores proinflamatórios.

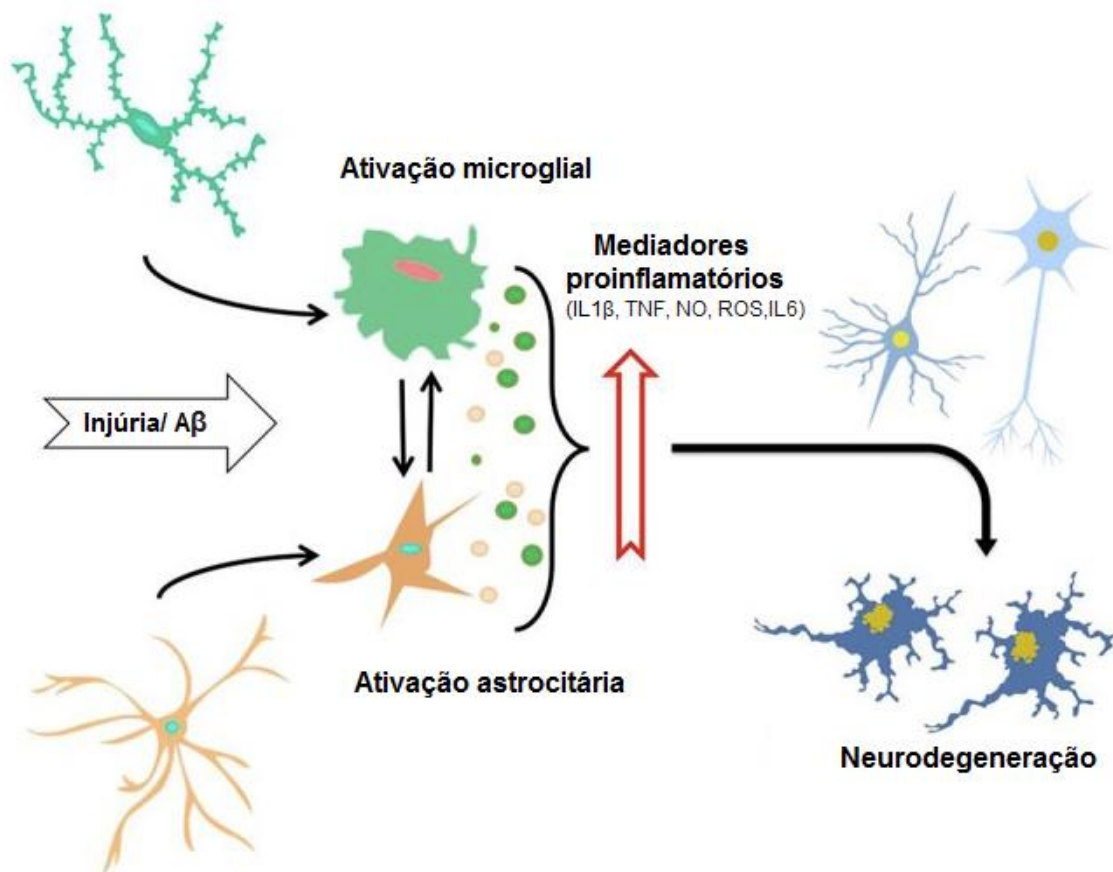


Figura 3: O processo neuroinflamatório.

Ao detectar sinais de injúria/A β , as microglias e os astrócitos são ativados, apresentam alterações morfológicas e secretam mediadores pró-inflamatórios. Assim, a exposição constante da glia ao A β e a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, levam a um processo neuroinflamatório crônico que eventualmente desencadeia a morte neuronal.

2.2.2 Principais abordagens terapêuticas

Atualmente o tratamento farmacológico preconizado para a DA é realizado principalmente através do uso de anticolinesterásicos. Esses fármacos promovem aumento da neurotransmissão colinérgica, através do aumento dos níveis de acetilcolina (MOTA *et al.*, 2012). Muitos estudos clínicos comprovam os efeitos benéficos dos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) na cognição e no comportamento (MASSOUD & LEGER, 2011; WALLIN *et al.*, 2011). Entretanto, os agentes anticolinesterásicos comumente usados (tacrina, donepezila, galantamina e rivastigmina) (COLOVIC *et al.*, 2013) possuem limitações devido à meia-vida curta e

aos efeitos indesejáveis. Os mais comuns incluem problemas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e hepatotoxicidade (MOTA *et al.*, 2012). Dentre os efeitos adversos secundários menos frequentes, destacam-se a bradicardia, câibras musculares, diminuição do apetite e perda de peso, assim como o aumento da produção de ácido gástrico (GUPTA *et al.*, 2011).

Tendo em vista o limitado arsenal de fármacos inibidores da AChE e a ausência de um tratamento que seja eficaz em retardar a progressão da doença, torna-se um desafio a busca por novas abordagens terapêuticas. Neste sentido, diversas substâncias têm sido estudadas visando o tratamento da DA, dentre elas estão os compostos flavonoides.

2.3 FLAVONOIDES E O SNC

Os flavonoides formam uma classe de compostos polifenólicos derivados de plantas. São encontrados em frutas, sementes, grãos, vegetais, flores, vinhos e chás, sendo então incluídos de maneira significativa na dieta humana. São metabólitos secundários sintetizados em resposta ao estresse como, infecções microbianas e radiação ultravioleta. Ademais, são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, além de combater o estresse oxidativo (AGATI *et al.*, 2011; WINKEL-SHIRLEY, 2002).

Estas substâncias são tipicamente classificadas em oito subgrupos: flavonas, flavonois, flavanonas, flavanois, antocianidinas, isoflavonas, chalconas e flavanonois (DE VILLIERS *et al.*, 2016). A estrutura básica dos flavonoides consiste em três anéis, dos quais dois são anéis aromáticos ligados através de um anel heterocíclico oxigenado (Figura 4). A presença ou ausência de insaturação do anel heterocíclico central, o grau de metilação e glicosilação caracterizam diferentes flavonoides numa mesma classe (HAVSTEEN, 2002).

O grau de metilação e glicosilação são características que influenciam na solubilidade dos flavonoides. Além disso, a variação no número e posição de grupamentos hidroxila medeiam o efeito antioxidante através do aprisionamento de espécies reativas (KUMAR & PANDEY, 2013).

Geralmente os flavonoides são encontrados na forma glicosilada sendo necessária a hidrólise por enzimas intestinais ou pela microbiota do cólon para serem absorvidos. Uma vez absorvidos, a maioria dos compostos é biotransformado no fígado, onde são produzidos metabólitos ativos que são transportados para as células e tecidos alvo (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010; MULLEN *et al.*, 2006; THILAKARATHNA & RUPASINGHE, 2013). As concentrações plasmáticas atingidas após o consumo de flavonoides variam a depender da sua estrutura e fonte alimentar. Como exemplo, Graefe e colaboradores (2001), detectaram concentrações de quercetina no plasma humano entre 0,3-1,6 µg/mL após o consumo de 100-200 mg equivalente administrado na forma de cebolas, chás ou refeições ricas em diversos produtos vegetais. A biodisponibilidade desses compostos também tende a variar a depender da natureza do flavonoide, podendo ser influenciada por alguns fatores, como o peso molecular (SCALBERT *et al.*, 2002), glicosilação (HOLLMAN *et al.*, 1997) e a interação com a microbiota do cólon (DEL RIO *et al.*, 2010).

Existem diferentes graus de permeabilidade dos flavonoides frente à barreira hematoencefálica (BHE) a depender do seu arranjo estrutural, o que estimula investigações sobre o seu potencial terapêutico em patologias do SNC (YOU DIM *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* utilizando culturas de células similares à BHE demonstraram a capacidade de alguns flavonoides e seus metabólitos atravessarem a barreira levando em consideração a citotoxicidade e a lipofilicidade desses compostos como fatores determinantes para o transporte transmembranar (YANG *et al.*, 2014; YOU DIM *et al.*, 2003;). Como exemplo, estudo realizado por Ferri e colaboradores (2015) demonstrou que a associação dos flavonoides quercetina e rutina com α -tocoferol foi capaz de favorecer o transporte dos flavonoides através da BHE de ratos.

Os flavonoides atuam interferindo em diversos processos intracelulares, como a ativação de enzimas antioxidantes (MAGALINGAM *et al.*, 2013), supressão de peroxidação lipídica (SCHINELLA *et al.*, 2010) inibição de mediadores proinflamatórios e proapoptóticos (RAZA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2011). Assim, diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antioxidante (SROKA *et al.*, 2015), anti-inflamatória (HUANG *et al.*, 2017), antitumoral (COELHO, P. L. C. *et al.*, 2016), neuroprotetora (KIM *et al.*, 2017) e antiviral (LANI *et al.*, 2016), o que lhe confere significativa importância farmacológica.

Estudos já demonstraram atividade neuroprotetora dos flavonoides contra diversos insultos neuronais, como acidente vascular cerebral isquêmico e neurotoxicidade induzida por glutamato (JEONG *et al.*, 2014; SINGH & CHOPRA, 2014). Segundo Leem e colaboradores (2014) em um modelo de doença de Parkinson utilizando a neurotoxina 1-metil-4-fenilpirídio (MPP+) em ratos, o flavonoide Naringina (8 ou 80 mg/kg; via intraperitoneal) foi capaz de proteger neurônios dopaminérgicos, através da inibição da ativação microglial e pelo aumento dos níveis do fator neurotrófico derivado de glia (GDNF) nesses neurônios. Além disso, Sabogal-Guaqueta e colaboradores (2015) em uma avaliação das propriedades neuroprotetoras do flavonoide quercetina (25 mg/kg; via intraperitoneal) utilizando camundongos transgênicos (3xTg-AD), demonstraram que o tratamento com o flavonoide foi capaz de reverter as características histopatológicas da DA, melhorar a função cognitiva e as alterações comportamentais desses animais.

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides está relacionada à modulação de células envolvidas na inflamação, como por exemplo, inibindo a proliferação dos linfócitos T, bem como, a produção de citocinas pró-inflamatórias ou mesmo modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico (LOPEZ-POSADAS *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2015). Em estudo realizado por Wang e colaboradores (2012), em linhagem de células microgliais BV-2 expostas ao peptídeo A β , o flavonoide rutina (32 mM) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de citocinas que desempenham papel chave na neuroinflamação, como TNF- α e IL-1 β .

Existem consideráveis evidências que suportam a noção de que a geração de radicais livres pode agir como um catalisador para o desenvolvimento de neuropatologias (GOLDEN *et al.*, 2002). Segundo estudo realizado por Choi, S. M. e colaboradores (2014), em cultura primária de neurônios corticais de camundongo, cuja morte neuronal foi induzida por peptídeo A β , dentre os dez flavonoides avaliados a epicatequina e a epigallocatequina galato, apresentaram atividade antioxidante contra o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), inibindo inclusive a morte dos neurônios.

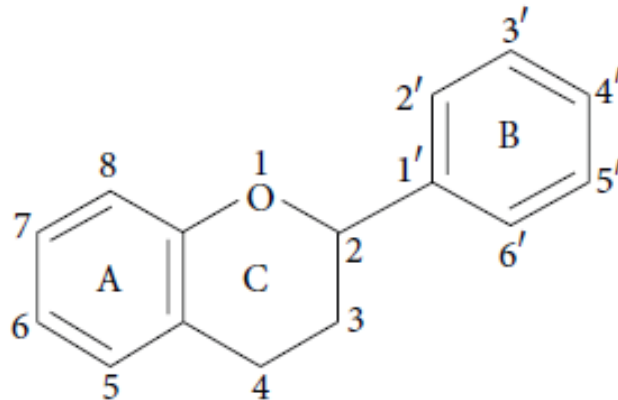


Figura 4: Estrutura química básica dos flavonoides.

Fonte: KUMAR & PANDEY, (2013).

2.3.1 Apigenina

A apigenina, classificada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) como 4,5,7-trihidroxiavona, é um flavonoide pertencente à classe das flavonas (figura 5). Encontrado em abundância nas frutas como a laranja, na camomila, aipo, salsa, vinho tinto, cebola e principalmente na *Passiflora*, ou flor do maracujá (MCKAY & BLUMBERG, 2006; ZHOU *et al.*, 2009). Apresenta baixo peso molecular (270,24 kD), solubilidade eficaz em dimetilsulfóxido (DMSO) (PATEL *et al.*, 2007) e capacidade de atravessar a BHE (POPOVIC *et al.*, 2014).

Diferentes estudos já demonstraram atividade ansiolítica e sedativa do extrato de *Passiflora*, o qual contém altas concentrações de apigenina (DENG *et al.*, 2010; DHAWAN *et al.*, 2001; KLEIN *et al.*, 2014). Segundo Gazola e colaboradores (2015) em um estudo realizado em camundongos, a apigenina (0,6 mg/kg; via oral) desempenhou um papel importante no efeito sedativo do extrato, sugerindo um potencial envolvimento dos receptores do ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABAA) na mediação do efeito. Ainda, a *Passiflora* tem sido vista como uma alternativa ao uso de drogas psicotrópicas, como os benzodiazepínicos, visto que pacientes com distúrbios do sono e ansiedade apresentaram redução do grau de ansiedade e melhora significativa do distúrbio do sono (VILLET *et al.*, 2016).

Esta flavona também apresenta outras atividades biológicas, como antioxidante (HAN *et al.*, 2012), antitumoral (COELHO, P. L. *et al.*, 2016), anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2015), neuroprotetora (BALEZ *et al.*, 2016) e próestrogênica (SOUZA *et al.*, 2015). Já foi demonstrado que o estrógeno é capaz de afetar a diferenciação e maturação dos neurônios (SRIVASTAVA *et al.*, 2013; ZAND *et al.*, 2000). E, segundo Souza e colaboradores (2015), a apigenina (10 μ M) foi capaz de induzir sinaptogênese e diferenciação das células-tronco pluripotentes humanas em neurônios, através da ativação de receptores de estrógeno. Zhang, F. e colaboradores (2014), revelaram que o tratamento com apigenina (10 e 20 mg/kg; via intraperitoneal) recuperou a função neuronal após lesão medular em ratos, este efeito neuroprotetor está em parte associado com as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas da apigenina. Assim, foi demonstrado o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase, redução da expressão de caspase-3 e dos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α .

Em um modelo de DA utilizando camundongos transgênicos (2xTg-DA), Zhao e colaboradores (2013) demonstraram que a apigenina (40 mg/kg; via oral) foi capaz de restabelecer os déficits de aprendizagem e melhorar a função cognitiva através da inibição do processo β -amiloidogênico e do aumento dos níveis de BDNF, demonstrando seu potencial neurotrófico. Adicionalmente Liu e colaboradores (2011), observaram melhora na aprendizagem espacial e memória, com aumento do nível cortical de BDNF, proteção neurovascular, inibição da acetilcolinesterase e elevação do nível de acetilcolina em camundongos com amnésia induzida por A β após administração oral de apigenina (10-20 mg/kg).

A propriedade anti-inflamatória da apigenina deve-se também à sua capacidade de inibir a produção e expressão de importantes mediadores inflamatórios como NO, COX-2 e iNOS (CHOI, J. S. *et al.*, 2014). Como descrito por Balez e colaboradores (2016) em estudo realizado em neurônios derivados de células-tronco pluripotentes induzidas geradas a partir de pacientes com DA, a apigenina (50 μ M) foi capaz de proteger contra a retração neurítica mediada por inflamação, através da redução da liberação de NO.

Segundo Zhang, X. e colaboradores (2014) a apigenina (25 μ M) também inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α e CCL5 em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS, componente principal da parede celular das bactérias gram-negativas) através da modulação das vias de

sinalização intracelular como, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) por meio da supressão da fosforilação da quinase ERK1/2 e bloqueio da ativação de NF- κ B em linhagem derivada de células de rim embrionário humano (HEK 239), previamente tratadas com IL-1 β e TNF- α . Os mesmos autores revelaram que a apigenina inibiu a produção de IL-1 β através do bloqueio da ativação da caspase-1 e interrupção da montagem do inflamassoma NLRP3.

De modo similar, porém em um estudo utilizando um modelo de lesão cerebral seguida de hemorragia subaracnóide em ratos, a apigenina (20 mg/kg; via intraperitoneal) suprimiu a ativação da via de sinalização TLR4/NF- κ B em neurônio, microglia e células endoteliais, e conseqüentemente foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , atenuando a neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2015).

Neste contexto, investigar a ação da apigenina em modelo *in vitro* de alta complexidade constitui uma estratégia para a descoberta de possíveis fármacos neuroprotetores cujo mecanismo de ação baseie-se em atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiapópticas e imunomoduladoras para processos neurodegenerativos como a DA.

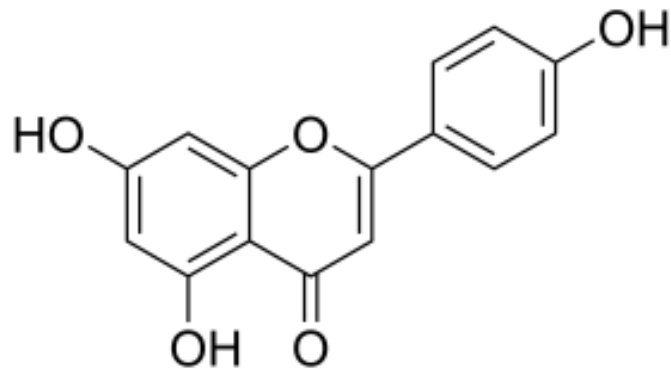


Figura 5: Estrutura da apigenina.

Flavona com distribuição de hidroxilas no carbono 7 e 5 do anel A e no carbono 4 do anel B.

Fonte: SHUKLA & GUPTA, (2010).

2.4 CO-CULTURA DE NEURÔNIO E GLIA COMO MODELO DE ESTUDO DAS DESORDENS NEURODEGENERATIVAS ASSOCIADAS A PROCESSOS NEUROINFLAMATÓRIOS

A despeito das pesquisas realizadas nos últimos anos envolvendo as doenças do SNC, as quais se concentravam no estudo dos neurônios, e com o crescente conhecimento do papel fisiológico da glia e seu impacto sobre estas desordens, novos modelos *in vitro* tornam-se necessários para ampliar a compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento destas doenças, bem como para encontrar novas estratégias terapêuticas (MEYER & KASPAR, 2017).

As culturas primárias de neurônios derivados do sistema nervoso central de embriões de roedores têm sido utilizadas para estudar princípios fundamentais da biologia de neurônios, definir mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de doenças e encontrar novos agentes terapêuticos com potencial neuroprotetor. Os estudos dirigidos para analisar os mecanismos envolvidos nas desordens do SNC incluem a utilização de métodos que medeiam lesões neuronais, através da exacerbação da resposta imune ou da formação de agregados proteicos intra ou extracelulares (LEONG *et al.*, 2015).

Dentre os modelos de estudo do SNC, destaca-se o sistema de cultura conhecido como co-cultura, em que os neurônios são mantidos sob uma monocamada de células gliais, as quais são cultivadas em meio enriquecido com soro animal, para dar suporte ao crescimento de novos neurônios (SILVA *et al.*, 2013). Neste trabalho foi utilizado o sistema de co-cultura usando três importantes insultos neuroinflamatórios, cujas abordagens anteriores no mesmo modelo não foram encontradas na literatura.

A importância do sistema de co-cultura está fundamentada não só na preservação da função e interação entre neurônios e células gliais, mas também na geração de fenótipos neuronais que mimetizam o arcabouço tecidual em condições biológicas similares às normais (AL-ALI *et al.*, 2017). A glia fornece suporte trófico para neurônios e exerce papel ativo na regulação de vários aspectos da função neuronal, através da secreção de moléculas envolvidas na neurogênese e sinaptogênese (SUN & BARRES, 2016).

A sinalização entre astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurônios tem sido relatada principalmente em modelos animais experimentais, pois essas células desempenham diversos papéis no SNC, tanto na manutenção da homeostase, quanto na potencialização do efeito deletério produzido por um agente estressor (através da indução da expressão de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios como EROs e NO). Evidências da análise de tecidos humanos *post-mortem* ou dissecados cirurgicamente e de modelos animais de patologias do SNC indicam que as disfunções astrogliais, por exemplo, contribuem para a patogênese de distúrbios neurológicos (DOSSI *et al.*, 2017), como exemplo a DA (ACOSTA *et al.*, 2017)

Ademais, o cultivo de células gliais na presença de neurônios permite estudar a interação parácrina entre as células gliais e neurônios, e realizar observação direta da localização de proteínas estruturais, da morfologia celular e da dinâmica de organelas (YANG *et al.*, 2017) sendo, portanto, um importante método para estudo de fármacos com ação sobre o SNC.

3 HIPÓTESE

A apigenina protege neurônios contra dano inflamatório característico da Doença de Alzheimer.

4 OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial neuroprotetor e anti-inflamatório da apigenina em modelos *in vitro* de neuroinflamação característica da Doença de Alzheimer.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o potencial anti-inflamatório da apigenina e imunomodulador das repostas astrogial e microglial em co-culturas de neurônios e células gliais submetidas a estímulo inflamatório por oligômeros β amiloide, lipopolissacarideo de *Escherichia coli* e interleucina 1 β .
- Avaliar o potencial neuroprotetor da apigenina em modelos *in vitro* de neuroinflamação induzida por lipopolissacarideo de *Escherichia coli* e interleucina 1 β em co-culturas de neurônios e células gliais.

5 METODOLOGIA

5.1 CO-CULTURA DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS

As culturas foram realizadas de acordo com método já bem estabelecido no laboratório de neuroquímica e biologia celular (LabNq) (PITANGA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). Foram utilizados ratos Wistar neonatos (P0-2 dias) para obtenção de células gliais e embriões (E14-16 dias) de gestação para obtenção de neurônios. Os animais foram obtidos no Biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia - UFBA.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA aprovados sob registro nº 0272012, compondo o projeto mais amplo intitulado “Estudo dos mecanismos de neurotoxicidade e prospecção farmacológica de alvos moleculares de derivados quimicamente ativos extraídos de plantas do estado da Bahia em células do SNC”.

Para a obtenção de células gliais, os animais foram eutanasiados por decapitação e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente. As meninges e os vasos sanguíneos foram retirados de cada córtex cirurgicamente e, em seguida, o material foi dissociado mecanicamente e filtrado em uma membrana de Nitex estéril de 75 mm ϕ . As células dissociadas foram cultivadas em meio DMEM HAM F12 (Gibco, 12500-039), suplementado com HEPES (3,6 g/L), glicose 50% (33 mM), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e bicarbonato de sódio (2,438 g/L), 6,25 μ g/mL de anfotericina B (Sigma A2942) e 10% soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY 12657). As células gliais foram semeadas em função dos experimentos a uma densidade de $3,3 \times 10^4$ células em placas de 96 poços (0,33 cm²), $2,0 \times 10^6$ em placas de 60 mm (21,2 cm²), $7,0 \times 10^4$ em câmaras de 8 poços (0,7 cm²) sobre lâmina, e $2,0 \times 10^5$ em placas de 24 poços (2 cm²), previamente tratadas com poli-ornitina (50 μ g/mL, Sigma P3655) e cultivadas em câmara úmida com 5% CO₂ a 37° C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h.

Após 15 dias, de cultivo iniciou-se a segunda etapa, que consistiu em um cultivo de neurônio sobre a monocamada de células gliais. Foram utilizados embriões de

ratos Wistar (E 14-16 dias). Após eutanásia utilizando uma câmara de CO₂, as fêmeas com quinze dias de gestação foram submetidas a cirurgia cesariana para retirada do útero gravídico. Os embriões foram retirados do útero e em seguida eutanasiados por decapitação. Seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente. As meninges e os vasos sanguíneos foram retirados de cada córtex cirurgicamente e, em seguida, forçados a passar por uma membrana de Nitex estéril de 75mm ϕ . As células dissociadas foram suspensas em meio DMEM HAM F12 (Gibco, 12500-039), suplementado com HEPES (3,6 g/L), glicose 50% (33 mM), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e bicarbonato de Sódio (2,438 g/L), 6,25 μ g/mL de anfotericina B (Sigma A2942) e 10% soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY 12657). Os neurônios foram semeados sobre a monocamada de células gliais a uma densidade de $16,5 \times 10^3$ células/cm² em placas de 96 poços, $1,0 \times 10^6$ em placas de 60 mm, $3,5 \times 10^4$ em câmaras de 8 poços e $1,0 \times 10^5$ em placas de 24 poços em função dos experimentos. As co-culturas foram mantidas por mais oito dias e o meio trocado a cada 48h. As análises foram realizadas após 24 e 48 h (figura 6).

5.2 TRATAMENTOS

5.2.1 Exposição ao lipopolissacarídeo (LPS)

Após o respectivo período de cultivo, co-culturas foram expostas à concentração de 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, Sigma Chemical Co L2880) por um período de 24 h. A solução estoque foi previamente diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) estéril a uma concentração de 1 mg/mL e mantida a -20°C. A diluição final do LPS foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução de estoque diretamente no meio de cultura. A concentração e o tempo de exposição adotados seguiram protocolos já estabelecidos (MORAES *et al.*, 2015).

5.2.2 Exposição à interleucina 1 β (IL1 β)

Após o respectivo período de cultivo, as co-culturas foram expostas diretamente à concentração de 10 ng/mL de interleucina-1 β recombinante (IL1 β , R&D Systems 501-RL-010), por um período de 24 h. A solução estoque foi previamente diluída em PBS estéril a uma concentração de 10.000 ng/mL e mantida a -20°C. A diluição final da citocina foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução de estoque diretamente no meio de cultura. A concentração e o tempo de exposição adotadas seguiram protocolos já estabelecidos (RADESATER *et al.*, 2003)

5.2.3 Solubilização e preparo de oligômeros do peptídeo β -amilóide

A solubilização do peptídeo β -amilóide a partir peptídeo A β 1-42 sintético (American Peptide) foi realizada no Grupo de Neuroenergética e Neuroproteção da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) conforme protocolo já estabelecido (DE FELICE *et al.*, 2008; LOURENCO *et al.*, 2013). O peptídeo A β 1-42 foi solubilizado a 1 mM em 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol (HFIP; Merck) gelado e a solução límpida e incolor resultante foi incubada à temperatura ambiente por 60 min. A solução foi então colocada em gelo por 10 min e aliqotada em fluxo laminar, em microtubos. Os microtubos foram deixados abertos na capela de fluxo laminar durante 12 h para evaporação do HFIP. A eliminação completa do HFIP foi feita por centrifugação em SpeedVac® por 10 min. As alíquotas contendo os filmes de A β foram estocadas a -20 °C para utilização posterior. Os estoques de filmes de A β (25 μ L da solução de HFIP para obter 0,113 mg de A β) foram cedidos pela UFRGS.

As preparações dos oligômeros de A β foram feitas, a partir destes estoques. Assim, uma alíquota de A β foi ressuspensa em dimetilsulfóxido 2% (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) de forma a obter uma solução a 5 mM. Esta solução foi diluída em PBS estéril a 100 μ M e incubada a 4 °C por 24 h. Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000 g por 10 min a 4 °C para remoção de agregados insolúveis de A β (fibrilas). O sobrenadante da centrifugação, contendo os oligômeros, foi mantido a 4 °C até a sua utilização. Para determinar a concentração dos oligômeros nas

preparações, utilizou-se o Kit BCA (BIO-RAD) pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

5.2.4 Exposição aos oligômeros A β

Após o respectivo período de cultivo, as co-culturas foram expostas diretamente à concentração final de 500 nM de oligômeros A β , por um período de 4 h. No momento dos experimentos, o A β foi diluído em meio de cultura para obtenção de solução na concentração de 500 nM, a partir de uma solução de estoque (100 μ M). A concentração e o tempo de exposição adotados seguiram protocolos já estabelecidos descritos na literatura (LOURENCO *et al.*, 2013).

5.2.5 Tratamento com a apigenina

O flavonoide apigenina (4',5,7-triidroxi-flavona) adotado neste estudo foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, 97% de pureza A3145). Este foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) até uma concentração de 100 mM formando uma solução estoque mantida no escuro a temperatura de -20 °C. A diluição final do composto foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução concentrada diretamente no meio de cultura. As células foram expostas ao flavonoide na concentração final de 1 μ M, que foi adotada para uso nos experimentos baseada em estudos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa LabNq, que revelaram que o flavonoide não apresenta citotoxicidade para astrócitos corticais (COELHO, P. L. *et al.*, 2016). As co-culturas tratadas por 24 h com o veículo de diluição DMSO, em volume equivalente à concentração da apigenina (0,01%), foram adotadas como controle, e não mostraram qualquer efeito significativo nos parâmetros analisados, quando comparado com culturas que não foram expostas a este solvente. As análises experimentais foram realizadas 24 h e 48 h após os tratamentos (Figura 6).

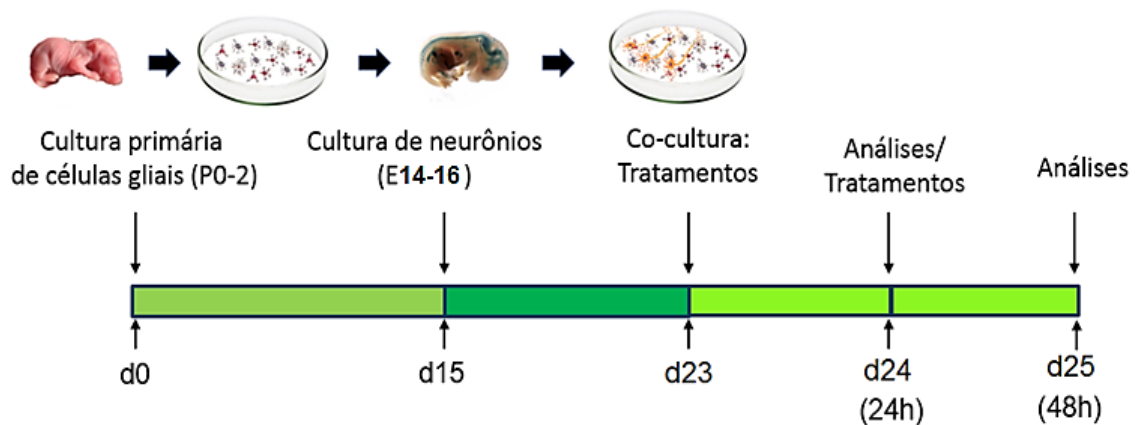


Figura 6: Delineamento experimental.

Co-culturas de células gliais e neurônios foram obtidas a partir do córtex de ratos Wistar. As co-culturas foram tratadas ou com A β (500 nM) durante 4 horas ou IL1 β (10 ng/mL) ou com LPS (1 μ g/mL), durante 24 horas, logo após a indução de dano (d23), o meio foi removido e então as co-culturas foram tratadas com apigenina (1 μ M) e analisadas após por 24 h (d24) ou 48 h (d25).

5.3 ANÁLISE DE DEGENERAÇÃO NEURONAL

Para investigar o potencial neuroprotetor da apigenina utilizou-se o ensaio com o reagente Fluoro-Jade B (FJB, Milipore, AG310), um marcador fluorescente de elevada afinidade para a localizar neurônios em degeneração (SCHMUCK & KAHL, 2009). As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo preto (Corning Incorporated, 3603), numa densidade de $3,3 \times 10^4$ células gliais/poço e $1,65 \times 10^4$ neurônios/poço. Foram realizados tratamentos com o LPS na concentração de 1 μ g/mL, por um período de 24 h. Posteriormente, as culturas foram tratadas com apigenina na concentração de 1 μ M e mantidas por um período de 24 h. Culturas tratadas com DMSO 0,01% foram adotadas como controle. Após tratamentos o sobrenadante das culturas foi removido e as células foram fixadas com etanol, a temperatura de 4°C por 10 min. As culturas foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS/Triton X-100 a 0,3%, por 10 min. Decorrido o período, as culturas foram lavadas três vezes com água destilada e incubadas com a solução de Fluoro-Jade B 0,001%, por 30 min, à temperatura ambiente sob agitação lenta e protegidas da luz. A seguir, as culturas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas

com o agente fluorescente intercalante de DNA 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) por 5 min, e lavadas novamente com PBS. Duas leituras foram realizadas em fluorímetro (Varioscan Thermo, Finlândia): a primeira no filtro 480/530 nm para quantificação do Fluoro-Jade B, e a segunda no filtro 350/470 nm, para a quantificação do DAPI. O resultado da quantificação da degeneração neuronal foi avaliado mediante a correlação entre a intensidade de fluorescência FJB/DAPI, os quais foram apresentados pela intensidade relativa de fluorescência (FJB/DAPI). Os experimentos foram realizados em octuplicatas e o resultado representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

5.4 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

A avaliação da resposta glial e neuronal foi realizada através da marcação imunocitoquímica fluorescente utilizando anticorpos específicos para as seguintes proteínas: beta-III tubulina (β tubIII), marcador estrutural de citoesqueleto neuronal; proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador de filamentos intermediários do citoesqueleto, exclusivo de astrócitos diferenciados; 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) análogo de timidina, marcador de proliferação celular; molécula adaptadora de ligação de cálcio 1 (Iba-1), marcador clássico da morfologia microglial; grupamento de diferenciação 68 (CD68), marcador lisossomal de microglia perfil M1 (pró-inflamatória); e para a proteína de caspase 3 clivada, marcador de apoptose, cujas especificações estão descritas na Tabela 1.

Durante os tratamentos, as culturas que foram designadas para a análise de proliferação celular foram também incubadas com BrdU a uma concentração de 10 μ M. A diluição final do BrdU foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução de estoque (60.000 μ M mantida a -20 °C) diretamente no meio de cultura.

Após exposição das culturas aos respectivos tratamentos, o meio de cultura foi desprezado, os poços foram lavados com PBS e as células fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% durante 20 min. Logo após, as células foram lavadas com PBS por três vezes e permeabilizadas com Triton X-100 (0,3%) em PBS, por 15 min. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS por três vezes durante 5 min. As

culturas incubadas com BrdU durante os tratamentos, após as lavagens com PBS, foram submetidas a desnaturação da DNA com ácido clorídrico (HCl) 2N por 20 min a temperatura ambiente, visando favorecer a interação do anticorpo primário anti-BrdU à proteína alvo. Em seguida, essas lamínulas foram lavadas novamente com PBS. Posteriormente, os sítios de ligação não específicos foram bloqueados pela incubação com PBS e albumina sérica bovina BSA (5 %) por 1 h. A próxima etapa constituiu em incubar o material a ser marcado com anticorpos primários

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS-BSA 1% e a incubação foi feita em câmara úmida a 4°C por 12 h. Posteriormente, as preparações foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpos secundários (Tabela 1) diluído em PBS-BSA 1%, mantidas sob agitação lenta, por 1 h, à temperatura ambiente de 37°C protegida da luz. Culturas em condições controle foram também marcadas somente com anticorpos secundários para controle de especificidade dos anticorpos. Ao final do período de incubação, foram realizadas lavagens seguidas com PBS por 10 min protegido da luz. Em seguida, para detecção da cromatina nuclear as culturas foram coradas com DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) na concentração de 5 µg/mL, durante 10 min, à temperatura ambiente, e as culturas lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas contendo meio de montagem N-propil galato em glicerol 80% (Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO), sendo então observadas em microscópio de fluorescência Leica® modelo DFC7000 T e em microscópio confocal Leica (SP8), com filtros adequados para fluorescência de cada anticorpo secundário. Para cada condição, foram selecionados aleatoriamente dez campos para quantificação manual das células marcadas e cada resultado representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imunocitoquímica.

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
GFAP-coelho (Dako) Cod. z0334	1:300	Goat Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L]. Cod A11012	1:500
β -TubIII - camundongo (Biolegend) Cod. 801202	1:500	Goat Alexa fluor® 488 anti- camundongo IgG [H&L] Cod. A11001	1:500
CD68 - rato, (Abcam) Cod. ab53444	1:100	Goat Alexa fluor® 555 anti-rato IgG [H&L] Cod. A21434	1:500
BrdU–camundongo (Sigma) Cod. B8434	1:200	Goat Alexa fluor® 546 anti- camundongo IgG [H&L] Cod. A11003	1:500
IBA1–coelho (wako) Cod. 01919741	1:200	Goat Alexa fluor® 488 anti-coelho IgG, IgA, IgM [H&L] Cod. A11008 e Goat Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L] Cod. A11012	1:500
Caspase3–coelho (Millipore) Cod. AB3623	1:300	Goat Alexa fluor® 594 anti-coelho IgG [H&L] Cod. A11012	1:500

5.5 EXTRAÇÃO DE RNA E qRT-PCR

Para quantificar a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de genes codificadores de proteínas de interesse, após o período dos tratamentos, o meio de cultivo foi removido e em seguida, realizada a etapa de extração do RNA. Sobre as células foi adicionado reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, 15596026), o qual facilita o isolamento do RNA. A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. A pureza e a concentração de RNA total foram determinadas por análise espectrofotométrica utilizando Nano Espectro

KASVI (cat# K23-0002). Para a retirada de DNA remanescente, o RNA foi tratado com DNase utilizando o Ambion® DNA-free™ kit (ambion cat# AM1906) e para a obtenção do cDNA de fita simples, em uso de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizou-se o Kit Master Mix superScript® VILO™ (Invitrogen, Life Technologies™ cat# MAN0004286), seguindo as instruções do fabricante.

A qRT-PCR foi realizada 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 e com o TaqMan® Universal Master Mix II com UNG (Catálogo # 4440038 invitrogen, life technologies™). As identificações dos ensaios para os genes quantificados neste estudo foram: BDNF (Rn02531967_s1), CCL5 (Rn00579590_m1), IL10 (Rn00563409_m1), IL6 (Rn01410330_m1), IL1β (Rn00580432_m1), NFT4 (Rn00566076_s1). Após homogeneização, os reagentes foram adicionados ao poço e para cada gene alvo foi realizado um ensaio “branco” com todos os reagentes do Kit. As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. E a quantificação gênica foi feita por espectrofluorimetria, utilizando o fluoróforo FAM (λ_{em} 517nm) para todas as amostras e o controle endógeno hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT 1, Rn01527840_m1) e o fluoróforo VIC (λ_{em} 551nm) para o controle e β -actina (Rn00667869_m1). A qRT-PCR em tempo real foi realizada utilizando o instrumento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). O HPRT e a β -actina foram utilizados como genes de referência (controles endógenos) para normalização dos dados de expressão gênica. O teste foi realizado em triplicata, os dados foram expressos usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e apresentados como mediana.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (California, EUA) e registrados como média \pm desvio padrão ou mediana dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi

realizada uma análise de variância através do teste One Way ANOVA, seguido do pós-teste Student-Newmann-Keuls, para os dados paramétricos. Para dados não paramétricos, foi realizada uma análise utilizando Kruskal-Walis e pós test Dunns. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

6 RESULTADOS

6.1 O FLAVONOIDE APIGENINA PROTEGE CONTRA NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA A NEUROINFLAMAÇÃO

6.1.1 Apigenina protege contra neurodegeneração associada a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

Visto que o LPS é um conhecido e potente indutor da resposta inflamatória, investigou-se o potencial neuroprotetor da apigenina contra a neuroinflamação clássica. Para isso, co-culturas de neurônios e células gliais foram expostas ao LPS (1 µg/mL) por 24 h, e em seguida tratadas com apigenina (1 µM). Decorrido o período de tratamento foi realizada a marcação para FJB. Observou-se que o tratamento com apigenina não provocou alteração na viabilidade neuronal quando comparado ao controle tratado com DMSO 0,01%. Enquanto que a indução de dano por LPS induziu degeneração neuronal, com aumento de $0,61 \pm 0,1362$ na intensidade relativa de fluorescência (IRF) em relação ao controle. Foi observado que após o dano com LPS, o tratamento com apigenina reduziu a IRF a níveis basais observados na condição controle, sugerindo o seu potencial neuroprotetor (figura 7).

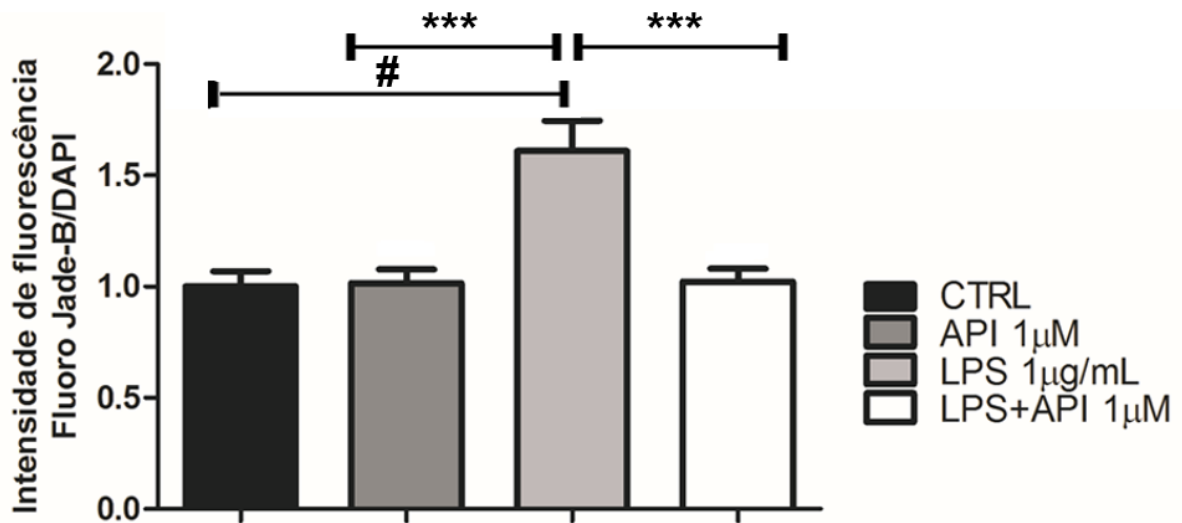


Figura 7: Efeito da apigenina na viabilidade neuronal.

Avaliação da degeneração neuronal pelo ensaio do FJB em co-culturas de neurônios e células gliais tratadas com 1 µM de apigenina (API), 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS), ou API e LPS (API+LPS) por um período de 24h. Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=8) da intensidade de fluorescência FJB. (#) representa diferença estatística em relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,001$, (***) representa diferença estatística em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,001$, testes estatísticos: ANOVA-Student Newman-Keuls.

Investigou-se também se o potencial neuroprotetor da apigenina estava associado a redução da indução de apoptose. Para tanto foi realizada avaliação por imunocitoquímica da expressão de caspase 3 ativada associada à de β -tubulina III neuronal (β tubIII). Foi observado que o tratamento com apigenina (1 µM) não induziu ativação de caspase 3 quando comparado ao controle (DMSO 0,01%). Entretanto, a indução de dano por LPS (1 µg/mL) promoveu ativação de caspase 3 em $1,6 \pm 0,1\%$ das células totais e $15,8 \pm 3,7\%$ das células β tubIII positivas, este aumento foi significativo comparado ao controle ($0,3 \pm 0,08\%$ e $3,4 \pm 1,1\%$, respectivamente). No entanto, após dano com LPS, verificou-se que o tratamento com apigenina reduziu significativamente a proporção de células caspase 3 positivas ($0,4 \pm 0,09\%$) e de células caspase 3/ β tubIII positivas ($3,7 \pm 0,7\%$) quando comparado às culturas tratadas com LPS e não demonstrou diferença no percentual dessas células quando comparado ao controle (figura 8).

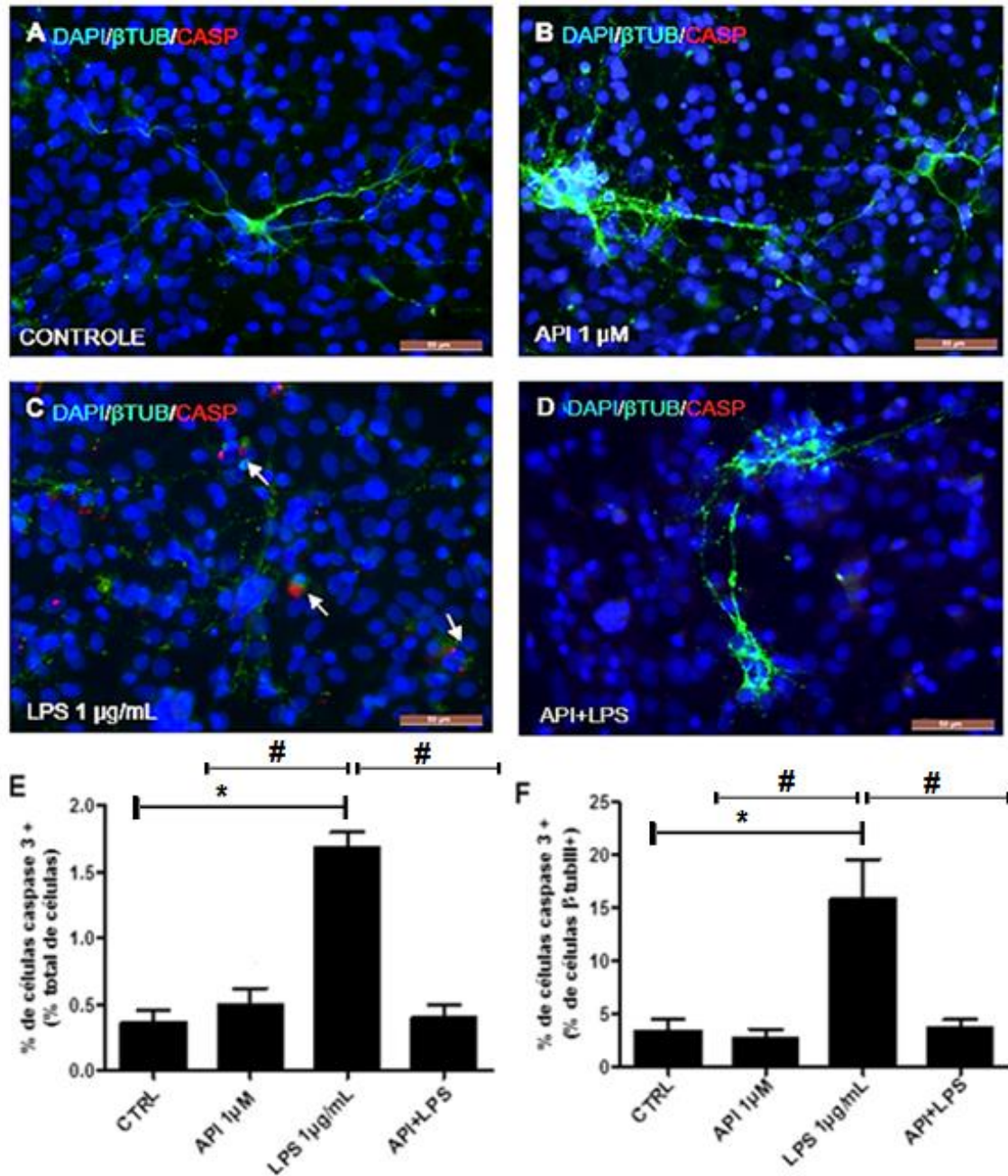


Figura 8: Análise do efeito neuroprotetor da apigenina por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

Co-culturas tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS), ou API e LPS (API+LPS) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína caspase 3 clivada (Casp 3+, em vermelho), β tubIII (em verde) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com LPS (C) ou tratadas com API+LPS (D). Nos gráficos E e F, os dados são expressos em média \pm desvio padrão (n=10) da marcação imunofluorescente das células caspase 3 e β tubIII positivas. Objetiva 40X; barra de escala: 50 μ m. As setas indicam células caspase 3 positivas. O gráfico E representa a população total de células caspase 3 positivas, e o F representa população de células duplamente marcadas para β TubIII e caspase 3. (*) representa significância estatística em relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,01$ e (#) representa significância estatística em

relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,01$, testes estatísticos: ANOVA-Student Newman-Keuls.

6.1.2 Apigenina protege contra neurodegeneração associada a neuroinflamação induzida por interleucina 1 β (IL1 β)

A IL1 β é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel fundamental no início e desenvolvimento de uma complexa cascata inflamatória celular. A produção exagerada de IL1 β no SNC principalmente por células gliais, está associada à neuroinflamação encontrada nos processos neurodegenerativos. Sabe-se que a neuroinflamação é considerada uma das características patológicas da DA, e a IL1 β tem sido associada a progressão DA em função do aumento do processamento da PPA, ativação robusta de microglia e astrócitos nas proximidades das placas de A β , exacerbação da resposta inflamatória e hiperfosforilação da proteína tau, culminando com a degeneração neuronal.

Para investigar o papel neuroprotetor da apigenina contra a neuroinflamação induzida por IL1 β , co-culturas de neurônios e células gliais foram expostas a IL1 β (10 ng/mL) por 24 h, e em seguida tratadas com apigenina (1 μ M). Decorrido o período de tratamento foi realizada a marcação por imunocitoquímica para caspase 3 ativada e β tubIII. Verificamos que o tratamento com apigenina não demonstrou significância estatística na ativação de caspase 3 quando comparado ao controle (DMSO 0,01%). Entretanto, a indução de dano por IL1 β promoveu ativação de caspase 3 em $1,7 \pm 0,1\%$ das células totais e $7,6 \pm 1,7\%$ das células β tubIII positivas quando comparado ao controle ($0,7 \pm 0,2\%$ e $2,3 \pm 1,0\%$, respectivamente). Contudo, o tratamento com apigenina após dano por IL1 β , reduziu o percentual de células caspase 3 positivas ($0,3 \pm 0,03\%$) e de células duplamente marcadas para caspase 3 e β tubIII ($1,0 \pm 0,4\%$) quando comparado com as culturas tratadas somente com IL1 β . Estes dados sugerem que a apigenina não induz morte celular e impede o progresso da apoptose em modelo de neuroinflamação (figura 9).

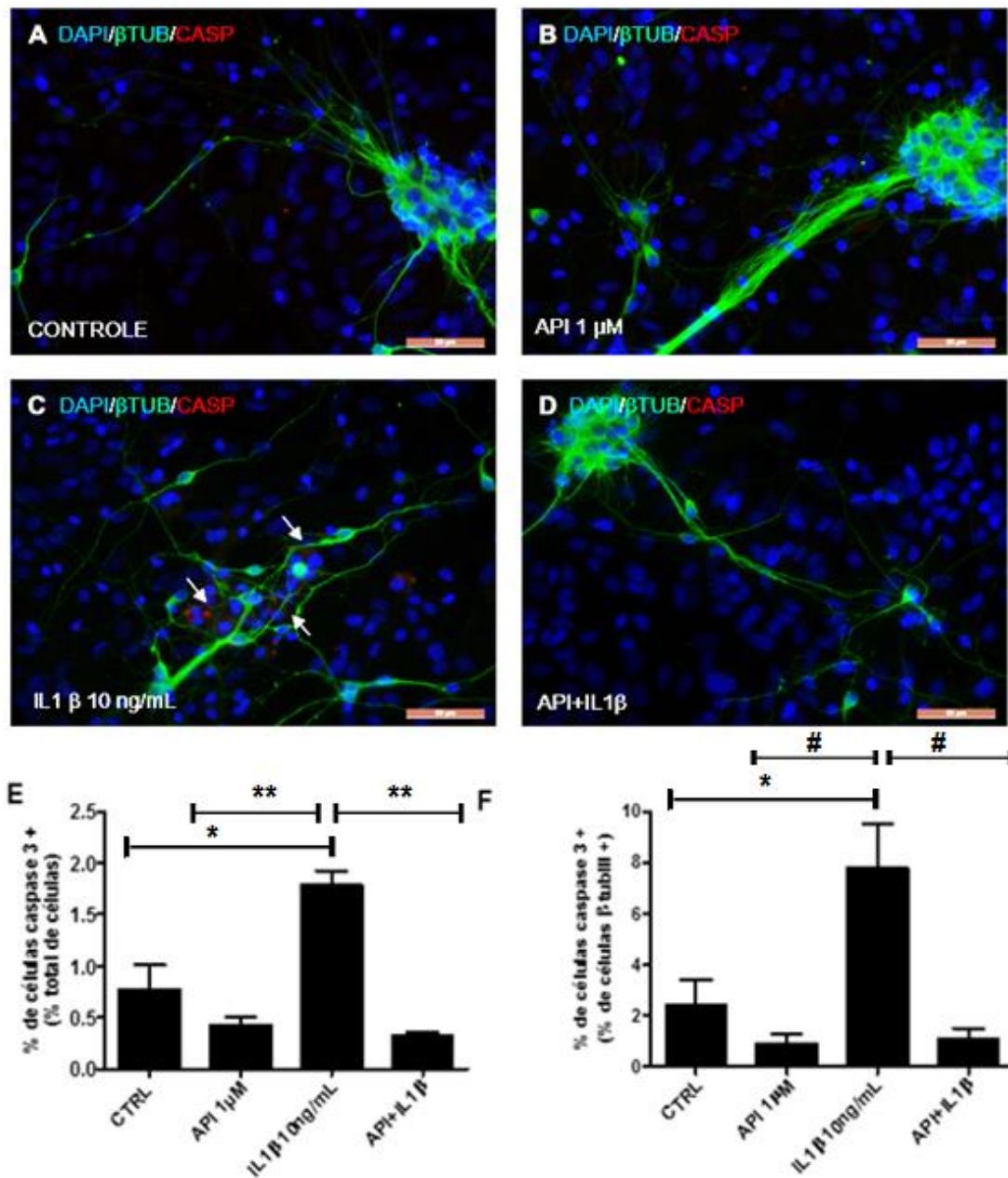


Figura 9: Análise do efeito neuroprotetor da apigenina por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β .

Co-culturas de células gliais e neurônios tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 10 ng/mL de interleucina 1 β (IL1 β), ou API e IL1 β (API+ IL1 β) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para caspase 3 (casp 3+, em vermelho), β tubIII (em verde) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com IL1 β (C) ou tratadas com API+IL1 β (D). Nos gráficos E e F, os dados são expressos em média \pm desvio padrão (n=10) da marcação imunofluorescente das células caspase 3 e β tubIII. Objetiva 40X; barra de escala: 50 μ m. As setas indicam células caspase 3 positivas. O gráfico E representa a população total de células caspase 3 positivas (*) representa significância estatística em relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de

$p < 0,01$ e (**) representa significância estatística em relação ao grupo tratado com IL1 β , com valor de $p < 0,01$. O gráfico F representa a população de células duplamente marcadas para β TubIII e caspase 3. (*) representa significância estatística em relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,001$ e (#) representa significância estatística em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,001$ (ANOVA-Student Newman-Keuls).

6.2 A APIGENINA MODULA O PERFIL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL NA PRESENÇA DE ESTÍMULO INFLAMATÓRIO.

6.2.1 Apigenina modula o perfil de ativação microglial em modelo de neuroinflamação induzida por LPS

A fim de avaliar a modulação do perfil microglial foi realizada imunomarcacão para proteína Iba-1, um clássico marcador estrutural de microglia, e CD68, um marcador específico de perfil M1. Verificou-se que o tratamento com apigenina (1 μ M) não demonstrou significância estatística no percentual de células Iba-1, nem de microglias CD68 positivas, quando comparado com o controle. Entretanto, após exposicão ao LPS (1 μ g/mL) foi observado aumento da porcentagem de células Iba-1 positivas (16,2 \pm 2,6%) e de microglias CD68 positivas (19 \pm 4,1%) em relacão ao controle (8,6 \pm 0,9% e 3,6 \pm 1,9%). Todavia, o tratamento com apigenina após dano por LPS, reduziu significativamente em 7,1 \pm 0,6% o percentual das células Iba-1 e em 5,2 \pm 1,9% das CD68 positivas quando comparado com as culturas tratadas apenas com LPS. Estes dados sugerem que a apigenina reduz a inflamação induzida por LPS (Figura 10).

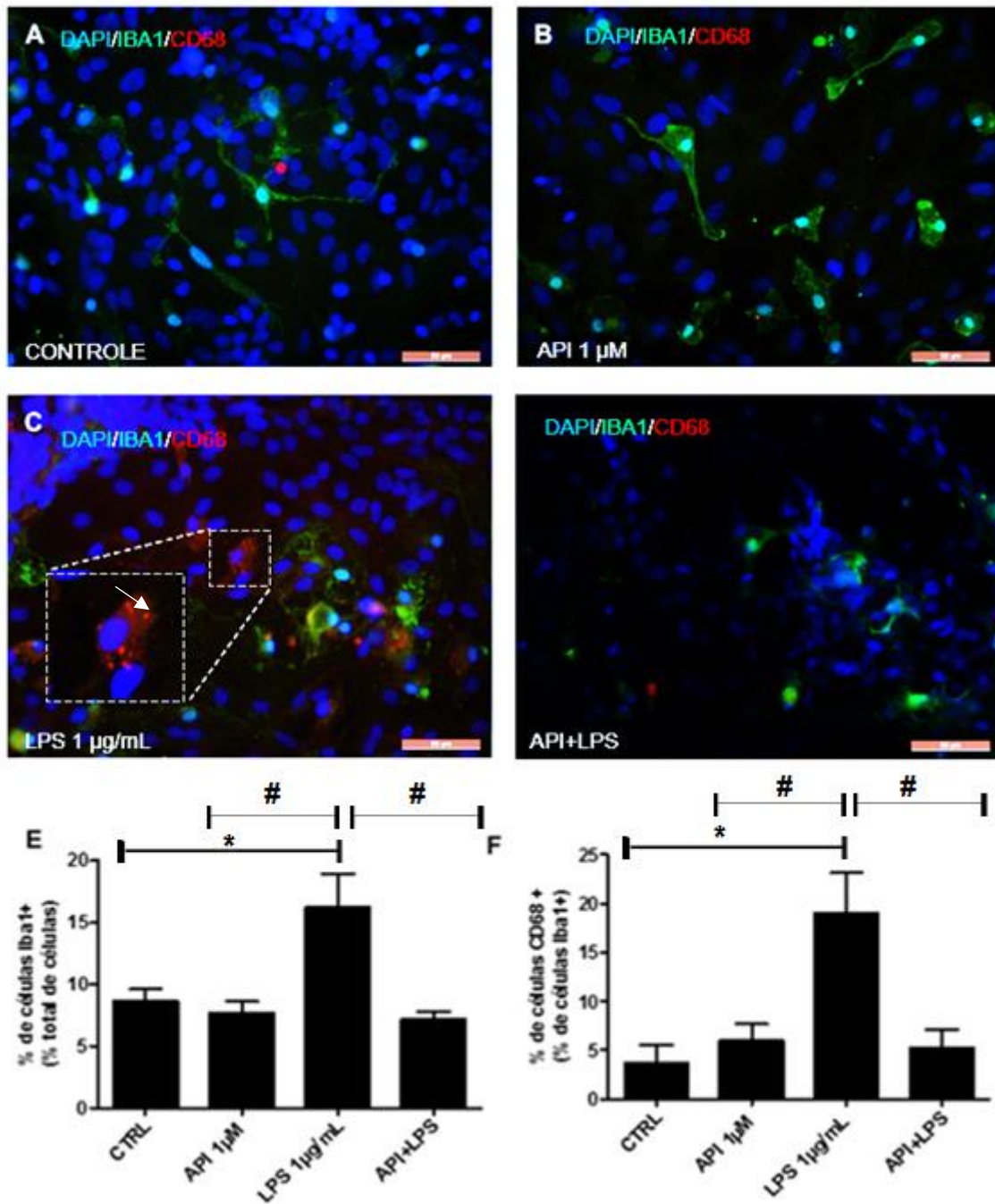


Figura 10: Avaliação do perfil microglial por imunocitoquímica.

Co-culturas tratadas com 1 μM de apigenina (API), 1 μg/mL de lipopolissacarídeo (LPS), ou API e LPS (API+LPS) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína CD68 (em vermelho), Iba-1 (em verde) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com LPS (C) ou tratadas com API+LPS (D). Objetiva 40X e barra de escala: 50 μm. (A seta indica microglia com marcações pontuais pra CD68). Em E e F, os dados são apresentados como porcentagem média ± desvio padrão (n=10) da marcação imunofluorescente para Iba-1 e CD68. O gráfico E representa a população total de células Iba-1 positivas. O gráfico F representa população de células duplamente marcadas para Iba-1 e CD68. (*) representa significância estatística em relação ao

controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,01$ e (#) representa significância estatística em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,01$. Testes estatísticos ANOVA-Student Newman-Keuls.

6.2.2 Apigenina modula o padrão morfológico microglial em modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β

A modulação do perfil microglial foi também avaliada baseada nas alterações morfológicas visualizadas através da imunomarcagem para proteína Iba-1. Verificamos que em condições controles tratadas com DMSO 0,01%, as microgliais apresentaram morfologia ramificada. O tratamento com apigenina (1 μ M) não demonstrou diferença na morfologia de células Iba-1 positivas quando comparado com o controle. Entretanto, a exposição à IL1 β (10 ng/mL) foi capaz de induzir alterações fenotípicas. Foi observado que nesta condição, as células Iba-1 positivas apresentaram morfologia ameboide. No entanto, o tratamento com apigenina após indução de dano com IL1 β , retomou o padrão morfológico visto na condição controle, apresentando morfologia ramificada quando comparado às culturas submetidas somente ao dano inflamatório induzido por IL1 β (Figura 11).

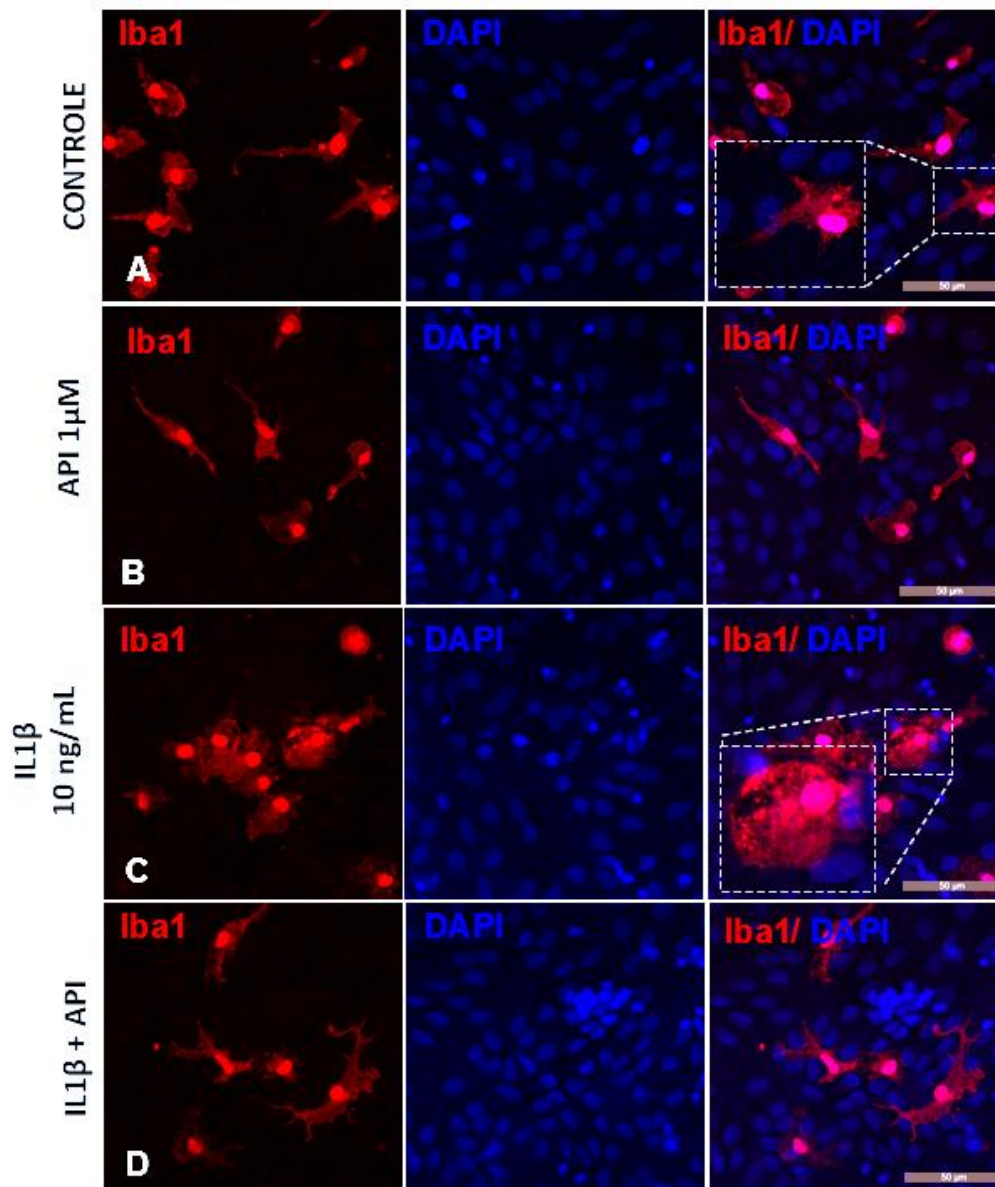


Figura 11: Análise da morfologia microglial por imunocitoquímica.

Co-culturas tratadas com 1 μM de apigenina (API), 10 ng/mL interleucina 1β (IL1β), ou API e IL1β (API+IL1β) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína Iba-1 (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com IL1β (C) ou tratadas com API+IL1β (D). Em A, B e D as células Iba-1 positivas apresentaram morfologia ramificada, em C apresentam morfologia amebóide. Objetiva 40X e barra de escala: 50 μm, microscopia confocal.

6.3 APIGENINA REDUZ PROLIFERAÇÃO MICROGLIAL ASSOCIADA A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS E POR OLIGÔMEROS DE A β .

Para avaliar o efeito da apigenina na proliferação microglial, foi realizada imunomarcção para Iba-1 e BrdU (*5-bromo-2-desoxiuridina*, análogo de timidina). Foi observado que o tratamento com apigenina (1 μ M) não demonstrou significância estatística no percentual de células duplamente marcadas para Iba-1 e BrdU quando comparado ao controle (DMSO 0,01%). Entretanto, após a indução de dano por LPS (1 μ g/mL), a porcentagem de células Iba-1 e BrdU positivas aumentou ($41,5 \pm 4\%$) em relação ao controle ($21,4 \pm 3,2\%$), o que caracteriza a proliferação microglial. Todavia, após o dano com LPS, o tratamento com apigenina reduziu significativamente o percentual de células Iba-1 e BrdU positivas ($9,4 \pm 2,8\%$) quando comparado com coculturas tratadas somente com LPS e não demonstrou significância estatística no percentual dessas células quando comparado ao controle. Estes resultados sugerem que a apigenina não induz proliferação microglial e reafirmam o seu efeito anti-inflamatório (figura 12).

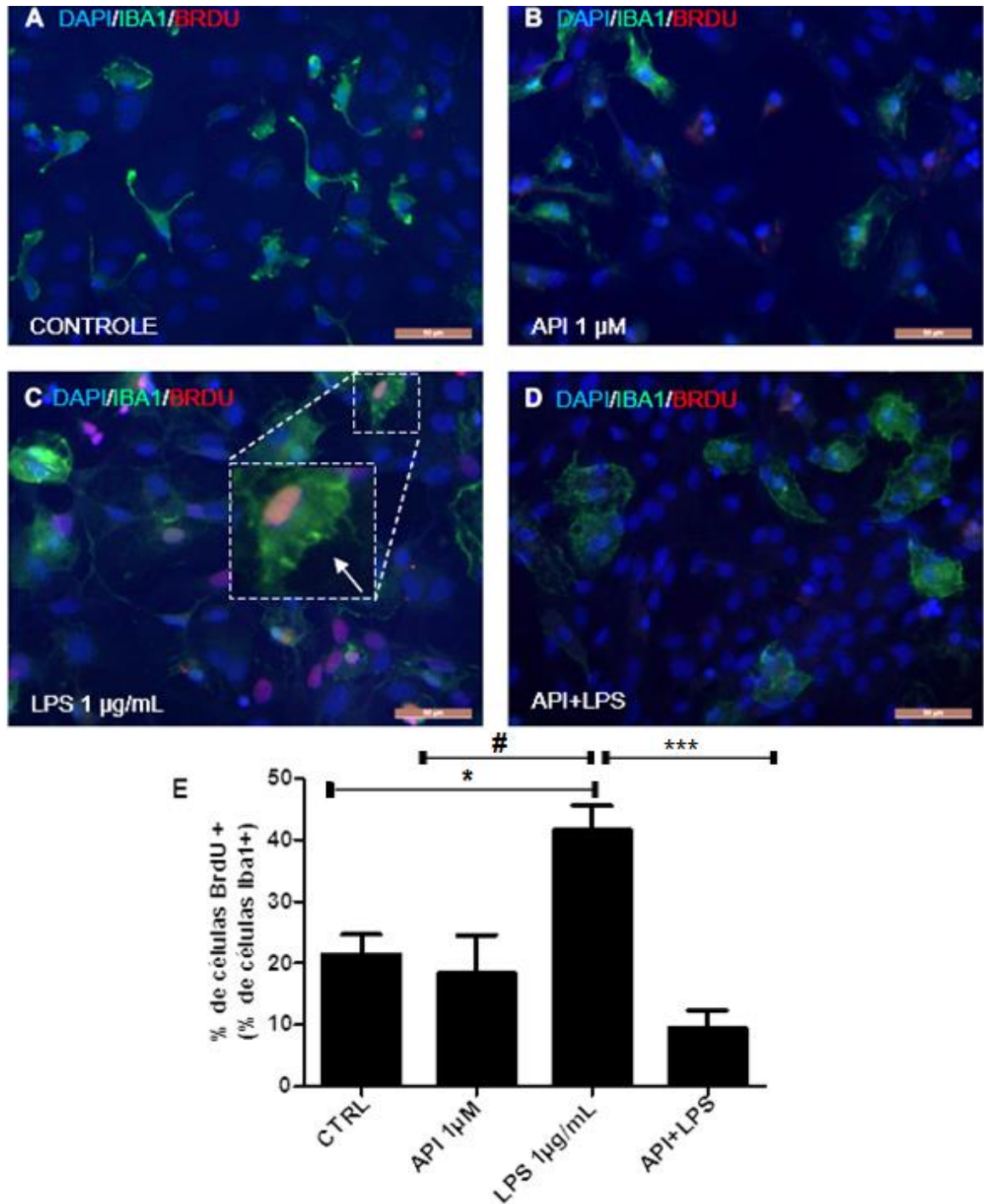


Figura 12: Avaliação da proliferação microglial por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

Co-culturas tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS), ou API e LPS (API+LPS) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína Iba-1 (em verde), BrdU (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com LPS (C) ou tratadas com API+LPS (D). A seta indica microglia BrdU positiva. Objetiva 40X; barra de escala: 50 μ m. O gráfico E representa população de células duplamente marcadas para Iba-1 e BrdU. Os dados são apresentados como porcentagem média \pm desvio padrão (n=10) da marcação imunofluorescente das células Iba-1 e BrdU. (*) representa significância estatística em

relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,01$, (#) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,01$ e (***) representa significância estatística em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,001$. Testes estatísticos ANOVA-Student Newman-Keuls).

A avaliação da proliferação microglial nas co-culturas de neurônios e células gliais expostas aos oligômeros A β (500 nM) por 4 h, e/ou tratadas com apigenina (1 μ M) por 24 h revelou que o tratamento com apigenina induziu proliferação de microglia em níveis similares às culturas em condições controle (DMSO 0,01%). No entanto, a indução de dano por A β promoveu proliferação microglial, com aumento da porcentagem de células Iba-1 e BrdU positivas ($33,7 \pm 7,7\%$) em relação ao controle ($12 \pm 2\%$). Contudo, após dano por A β , o tratamento com apigenina reduziu significativamente o percentual de células Iba-1 e BrdU positivas ($8 \pm 2,4\%$) quando comparado com culturas tratadas somente com A β (figura 13).

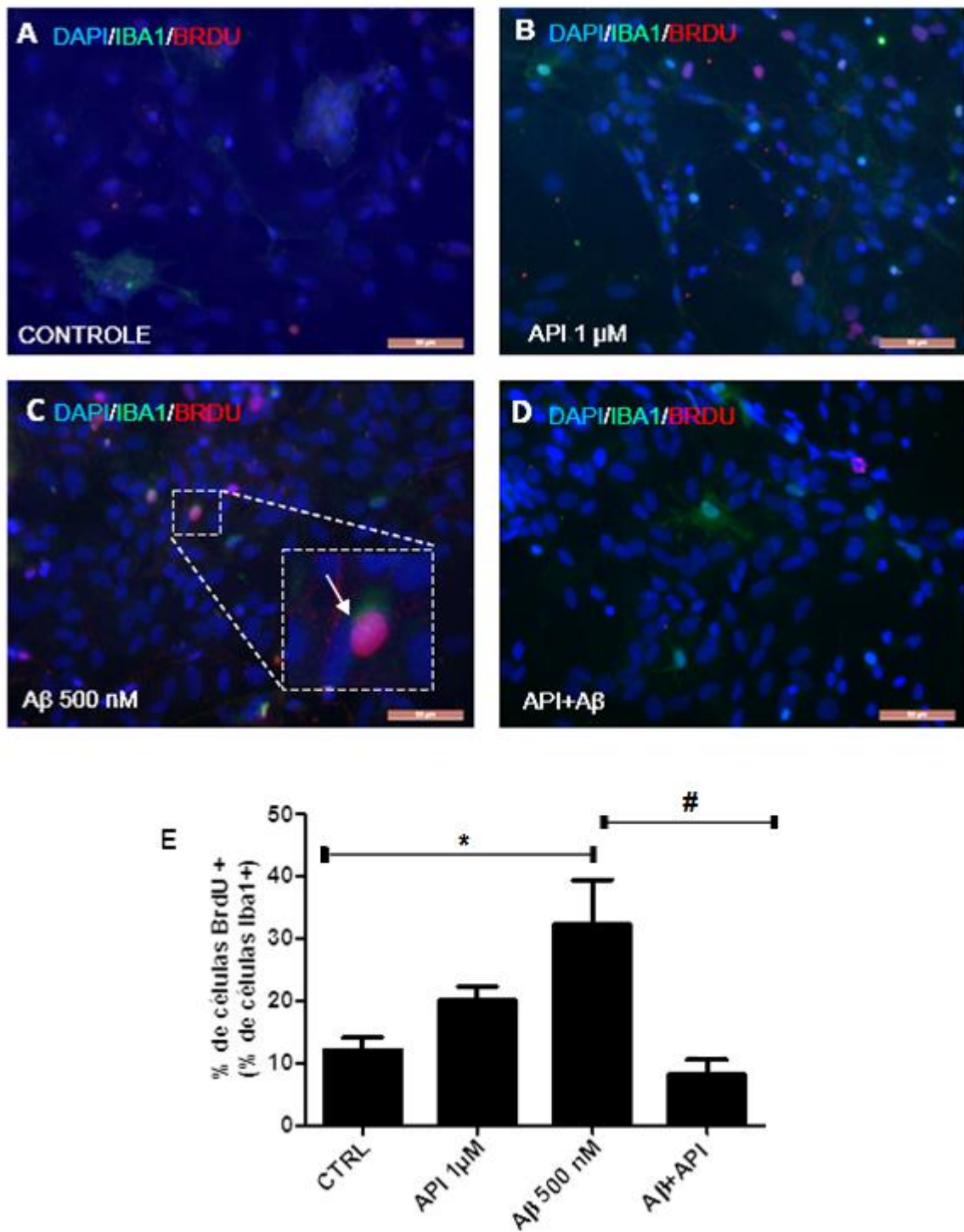


Figura 13: Avaliação da proliferação microglial por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por oligômeros A β .

Co-culturas tratadas por 24 h com 1 μ M de apigenina (API), por 4 h com 500 nM de oligômeros A β (A β), ou com API e A β (API+A β). Marcação imunocitoquímica para proteína Iba-1 (em verde), BrdU (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), tratadas com API (B), tratadas com A β (C) ou tratadas com API+ A β (D). A seta indica microglia BrdU positiva. Objetiva 40X e barra de escala: 50 μ m. O gráfico E representa população de células duplamente marcadas para Iba-1 e BrdU.

Os dados são apresentados como porcentagem média \pm desvio padrão (n=10) da marcação imunofluorescente das células Iba-1 e BrdU. O (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (DMSO 0,01%) com valor de $p < 0,05$, (#) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com LPS, com valor de $p < 0,01$. Testes estatísticos ANOVA-Student Newman-Keuls.

6.4 APIGENINA PRESERVA A MORFOLOGIA NEURONAL E ASTROCITÁRIA E RESTABELECE O PERFIL MORFOLÓGICO APÓS ESTÍMULO INFLAMATÓRIO.

6.4.1 A apigenina preserva a morfologia de neurônios e astrócitos em modelos de neuroinflamação induzida por LPS, IL-1 β e oligômeros A β

A fim de avaliar a morfologia de neurônios e astrócitos, foi realizada imunomarcação para β tubIII e GFAP, respectivamente. Observamos que o tratamento com apigenina (1 μ M) (Figura 14 B) preservou a rede de neuritos, manteve a integridade do corpo celular dos neurônios e a morfologia poligonal típica dos astrócitos, semelhante a condição controle com DMSO 0,01% (Figura 14 A). Entretanto, após a indução de dano por LPS (1 μ g/mL) a rede de neuritos não foi preservada. São observadas apenas marcações perinucleares, corpos celulares associados formando agrupamento irregular. Além disso, os astrócitos apresentaram morfologia reativa, caracterizada pela presença de processos que se estendem a partir da soma aparentemente mais longos (figura 14 C). Todavia, o tratamento com apigenina após dano por LPS, manteve morfologia de astrócitos não reativos (similar ao observado em condições controle) e preservou a integridade neuronal e suas redes de interconexões quando comparado com culturas tratadas apenas com LPS (figura 14 D).

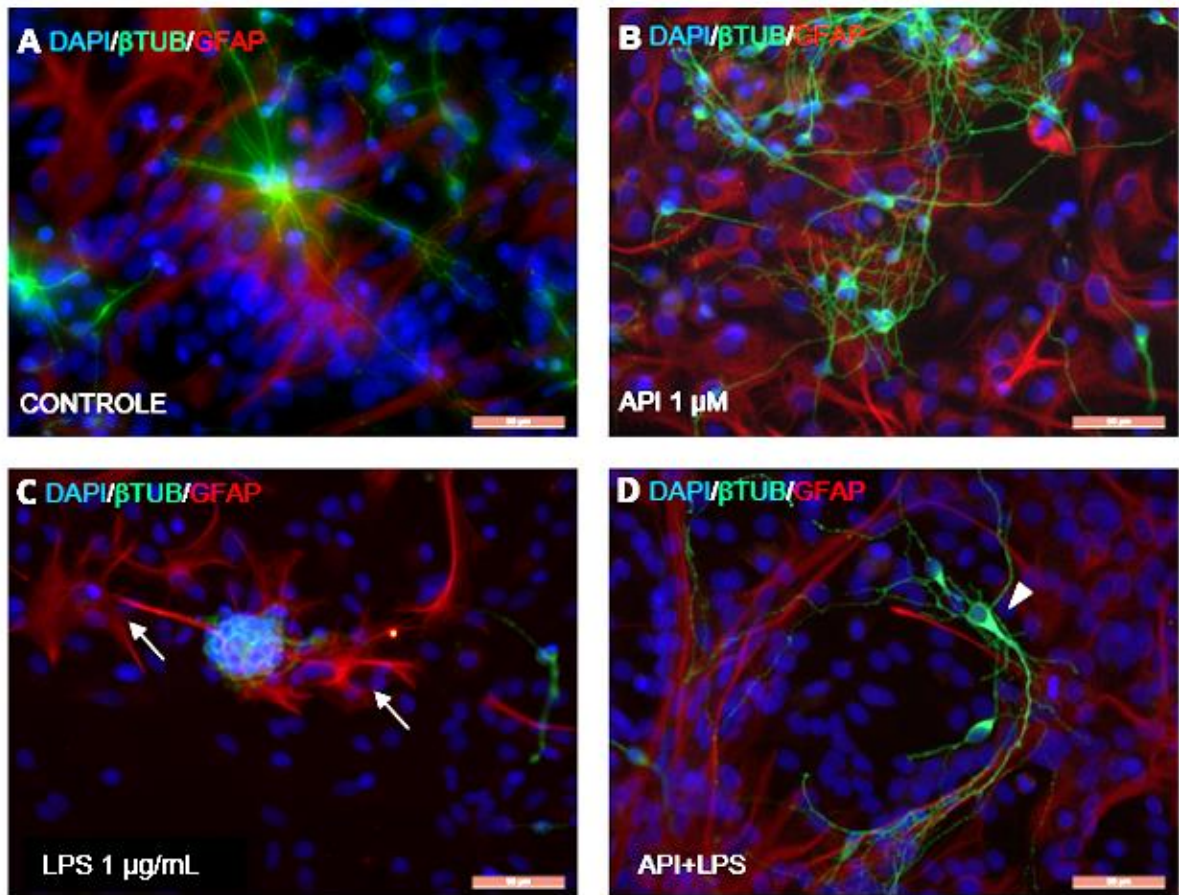


Figura 14: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida LPS.

Co-culturas tratadas com 1 μM de apigenina (API), 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS), ou API e LPS (API+LPS) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína βtubIII (em verde), GFAP (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), API (B), LPS (C) ou API+LPS (D). Objetiva 40x e barra de escala: 50 μm . (As setas indicam astrócitos reativos, e a cabeça da seta indica um neurônio multipolar, o qual possui um axônio e vários dendritos, constituem a maioria dos neurônios do SNC).

O efeito da apigenina na morfologia de neurônios e astrócitos foi confirmado no modelo de neuroinflamação induzido por $\text{IL1}\beta$ (Figura 15 B). Após a indução de dano por $\text{IL1}\beta$ (10 ng/mL), foram observadas poucas células marcadas para βtubIII quando comparado com o controle. Além disso, verificou-se a emissão de prolongamentos com alta imunorreatividade à GFAP, característico de astrócitos reativos (figura 15 C). Todavia, o tratamento com apigenina após dano por $\text{IL1}\beta$, foi capaz de manter a rede de neuritos íntegra, aumentar a intensidade da marcação para βtubIII com formação

de agrupamentos de neurônios, além da preservação da morfologia dos astrócitos semelhante a observado nas condições controle (figura 15 D).

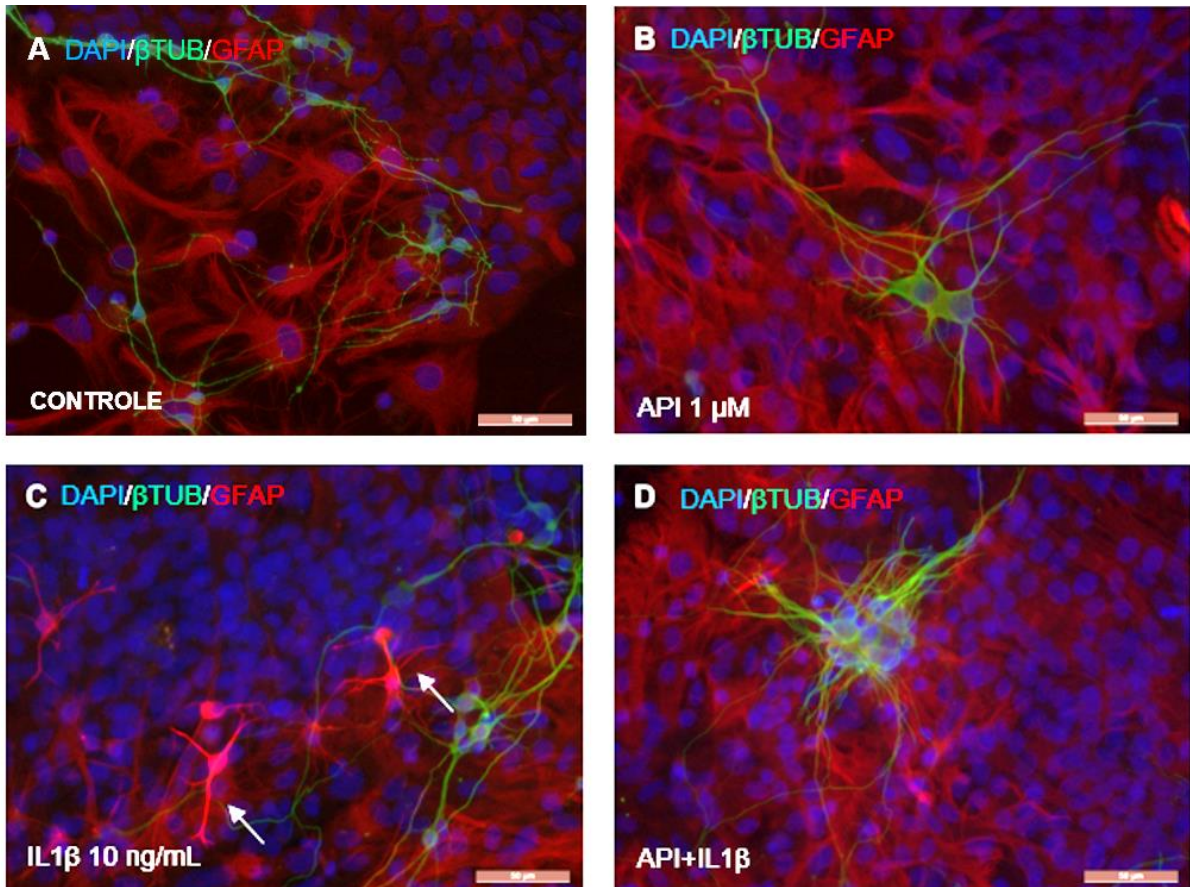


Figura 15: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β .

Co-culturas tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 1 μ g/mL de interleucina 1 β (IL1 β 10 ng/mL) ou API e IL1 β (API+IL1 β) por um período de 24 h. Marcação imunocitoquímica para proteína β tubIII (em verde), GFAP (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), API (B), IL1 β (C) ou API+ IL1 β (D). Objetiva 40x e barra de escala: 50 μ m. (As setas indicam astrócitos reativos).

Após a indução de dano por A β (500 nM), a marcação para β tubIII foi escassa e os astrócitos apresentaram emissão de prolongamentos com alta imunorreatividade à GFAP, sugerindo reatividade glial (figura 16 C). No entanto, o tratamento com apigenina após dano por A β , foi capaz de aumentar a intensidade da marcação para β tubIII com formação de agrupamentos neurais e retomar a morfologia astrocítica a

condições semelhantes ao controle (figura 16 D), o que corrobora com os achados que demonstram o potencial neuroprotetor e gliomodulador do flavonoide.

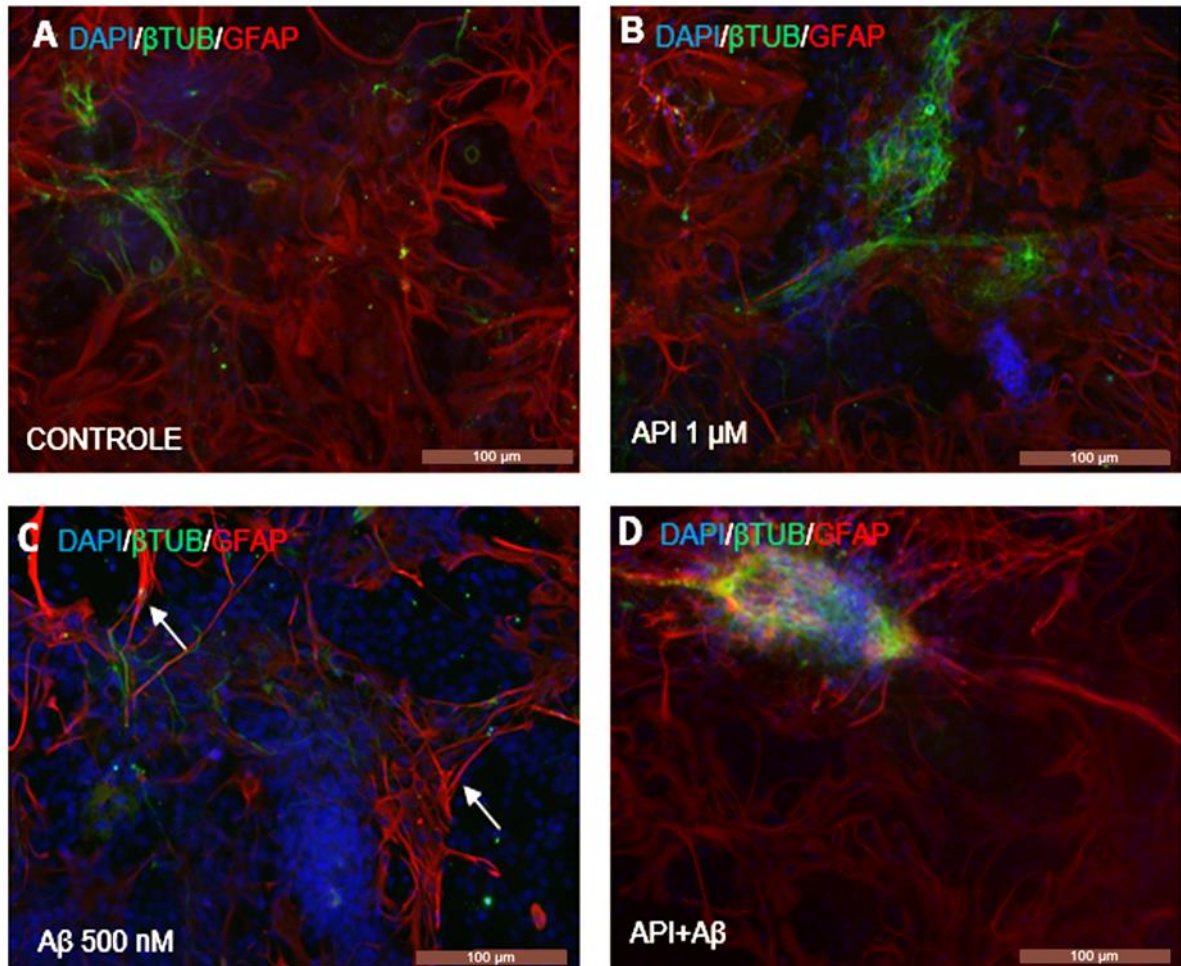


Figura 16: Análise da morfologia de neurônios e astrócitos por imunocitoquímica em modelo de neuroinflamação induzida por oligômeros A β .

Co-culturas tratadas por 24 h com 1 μ M de apigenina (API), por 4 h com 500 nM de oligômeros A β (A β), ou com API e A β (API+A β). Marcação imunocitoquímica para proteína β tubIII (em verde), GFAP (em vermelho) e DAPI (em azul), em condições controle (DMSO 0,01%) (A), API (B), A β (C) ou API+A β (D). Objetiva 20x e barra de escala: 100 μ m (As setas indicam astrócitos reativos).

6.5 O FLAVONOIDE APIGENINA APRESENTA POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO

Para confirmar o efeito anti-inflamatório da apigenina, co-culturas foram expostas à IL1 β (10 ng/mL) por 24 h, e em seguida tratadas com apigenina (1 μ M).

Decorrido o período de tratamento, os níveis de expressão de RNAm dos mediadores pró-inflamatórios IL6, CCL5 e IL1 β e da citocina regulatória IL-10, foram avaliados por qRT-PCR. Foi observado no tratamento com apigenina, níveis de expressão relativa de IL6 similares aos encontrados no controle com DMSO (0,01%) (1,0). Entretanto, demonstrou-se que após indução de dano com IL1 β , houve aumento na expressão de RNAm de IL6 (19,0) quando comparado ao controle. Contudo, após dano com IL1 β , o tratamento com apigenina reduziu os níveis de IL6 (14,1), quando comparado com culturas tratadas apenas com IL1 β (Figura 17. A).

Da mesma forma ao observado para a citocina IL6, a apigenina não demonstrou diferença na expressão de RNAm de CCL5 quando comparado ao controle (DMSO 0,01%) (1,0). Entretanto, foi demonstrado aumento na expressão relativa do gene de CCL5 (66,5) após dano com IL1 β , quando comparado com controle. Todavia, após indução de dano com IL1 β , o tratamento com apigenina foi capaz de reduzir (61,0) a expressão gênica de CCL5 quando comparado com culturas tratadas somente com IL1 β (Figura 17. B).

Verificou-se que o tratamento com apigenina não alterou os níveis de expressão de IL1 β quando comparado ao controle com DMSO (0,01%) (1,0). No entanto, após indução de dano com IL1 β , foi possível observar aumento (2,3) na expressão gênica de IL1 β quando comparada à condição controle. Da mesma forma, o tratamento com apigenina não foi capaz de modular a expressão gênica após a indução de dano com IL1 β , quando comparado às culturas tratadas somente com IL1 β (Figura 17. C).

Por fim, foi avaliada a expressão gênica de IL10. Observou-se que a apigenina não demonstrou diferença na expressão de RNAm de IL10 quando comparado ao controle com DMSO (0,01%) (1,0). Entretanto, após indução de dano por IL1 β , foi observado redução dos níveis de expressão de IL10 (0,3) quando comparado à condição controle. No entanto, pode-se observar que o tratamento com apigenina após indução do dano com IL1 β , induziu aumento dos níveis de expressão de IL10 (0,6) quando comparado com culturas tratadas apenas com IL1 β . Juntos, estes resultados mostram que a apigenina é capaz de reduzir a inflamação induzida por IL1 β (Figura 17. D).

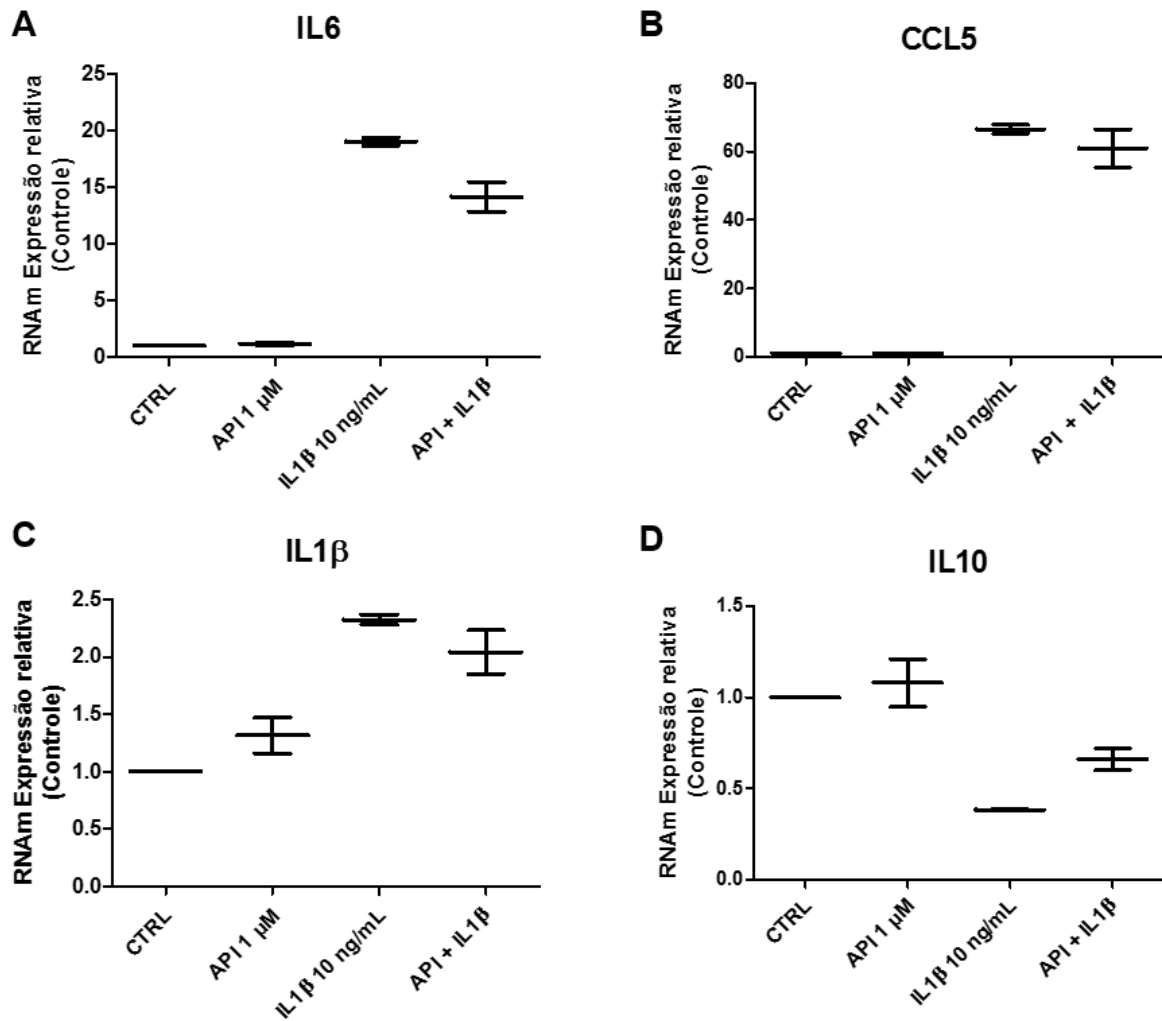


Figura 17: Análise da expressão relativa de mediadores pró-inflamatórios e regulatórios por qRT-PCR. Análise da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e regulatórias por RTq-PCR em co-culturas tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 10 ng/mL de de interleucina 1 β (IL1 β) ou API e IL1 β (API+IL1 β) por um período de 24 h. Em A, avaliação da expressão do gene da IL6, em B, avaliação da expressão do gene da CCL5, em C, avaliação da expressão do gene da IL1 β e em D, avaliação da expressão do gene da IL10. Os dados foram apresentados em mediana (n=2) e a análise de variância foi realizada utilizando One-Way ANOVA para múltipla comparação, seguido do teste Kruskal-Wallis e do pós test Dunn's.

6.5.1 Perfil de expressão de neurotrofinas em co-culturas de neurônios e células gliais em um modelo de neuroinflamação induzida por IL1 β

Ainda, com a finalidade de avaliar os níveis de expressão das neurotrofinas BDNF e neurotrofina 4 (NFT4), co-culturas foram expostas a IL1 β (10 ng/mL) por 24

h, e em seguida tratadas com apigenina (1 μ M). Decorrido o período de tratamento, os níveis de expressão dos fatores neurotróficos, foram avaliadas por qRT-PCR. Foi possível observar que a apigenina foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de BDNF (14,4) quando comparado ao controle com DMSO (0,01%) (1,0). Entretanto, a indução de dano com IL1 β , apresentou redução dos níveis de expressão de BDNF (0,5) quando comparado ao controle. No entanto, após indução de dano com IL1 β , o tratamento com apigenina demonstrou aumento da expressão de RNAm de BDNF (10,22) quando comparado ao grupo tratado apenas com IL1 β e à condição controle (Figura 18. A).

Os níveis da neurotrofina NTF4 também foram avaliados. Os seguintes dados revelaram que, co-culturas tratadas com apigenina alcançaram níveis de NTF4 semelhantes aos das culturas em condições controle com DMSO (0,01%). E não foi observado diferença nos níveis de expressão de NTF4 em culturas tratadas com IL1 β , nem em culturas tratadas com apigenina após exposição à IL1 β quando comparado ao grupo controle (Figura 18. B).

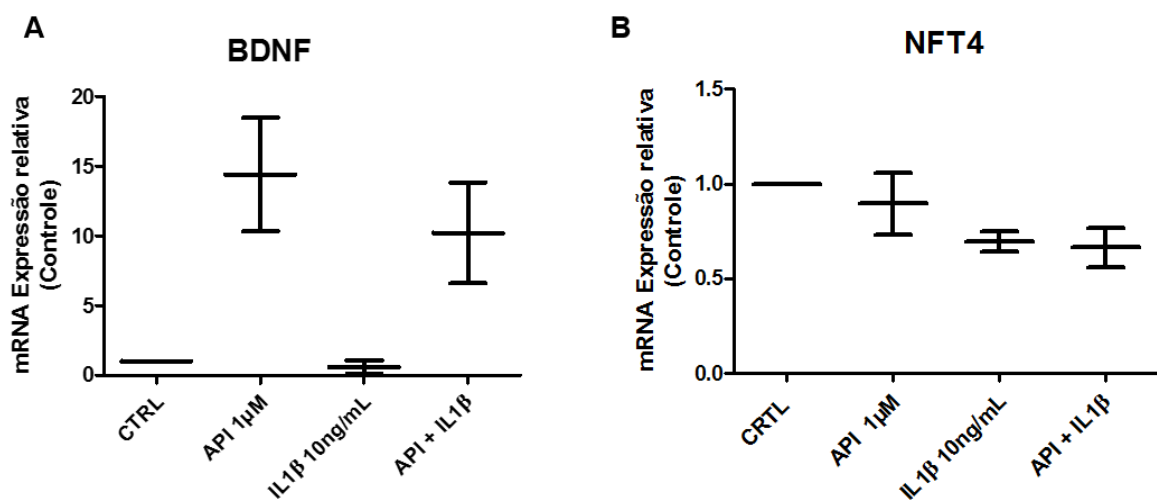


Figura 18: Análise da expressão relativa de neurotrofinas por qRT-PCR.

Análise da expressão de fatores neurotróficos por RTq-PCR em co-culturas tratadas com 1 μ M de apigenina (API), 10 ng/ml de interleucina 1 β (IL1 β) ou API e IL1 β (API+IL1 β) por um período de 24 h. Em A, avaliação da expressão do gene do BDNF, em B, análise da expressão do gene do NTF4. Os dados foram apresentados em mediana (n=2) e a análise de variância foi realizada utilizando One-Way ANOVA para múltipla comparação, seguido do teste Kruskal-Wallis e do pós test Dunn's.

7 DISCUSSÃO

Muitos modelos *in vitro* de estudo do sistema nervoso central (SNC) têm sido desenvolvidos a fim de elucidar os mecanismos associados a insultos que cursam com a morte de neurônios, e assim encontrar melhores alvos terapêuticos contra doenças neurodegenerativas associadas à neuroinflamação. Dentre estes modelos, destaca-se a co-cultura de neurônio e glia, a qual possui diversas vantagens, especialmente por se tratar de um método que utiliza alta densidade celular, o que pode favorecer a geração de fenótipos neuronais que interajam ativamente com as células gliais e mimetizem condições biológicas similares às teciduais (AL-ALI *et al.*, 2017).

Neste estudo foi utilizado como modelo experimental, co-culturas de neurônios e células gliais já bem estabelecido no LabNq (PITANGA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017) para investigar a atividade anti-inflamatória e neuroprotetora do flavonoide apigenina em três diferentes modelos de neuroinflamação induzida por LPS (neuroinflamação clássica), por IL1 β ou por oligômeros A β .

Evidências indicam que a expressão de IL-1 β é um dos fatores neuropatológicos mais importantes na DA, sendo reconhecida como fator central na neuroinflamação (AZIZI & MIRSHAFIEY, 2012; XIE *et al.*, 2015). Entre as citocinas inflamatórias associadas à doença, a IL-1 β tem sido implicada em desempenhar importante papel na progressão desta patologia. Kitazawa e colaboradores (2011), observaram em ratos 3xTg-DA que receberam anticorpo bloqueador do receptor de IL-1 β via intraperitoneal, redução da ativação de NF- κ B. Além disso, o bloqueio da sinalização de IL-1 β restaurou os déficits cognitivos através da redução dos níveis de IL-1 β e das espécies de A β oligomérica no cérebro desses animais. Deste modo, a busca de novos fármacos que visem atenuar a neuroinflamação, pode revelar-se uma valiosa estratégia no tratamento das desordens neurodegenerativas, dentre as quais, a DA. E, este trabalho é pioneiro em demonstrar a influência da apigenina na proteção contra o dano inflamatório característico da DA.

Neste trabalho, foi demonstrado que a apigenina não é neurotóxica na concentração testada e possui potencial neuroprotetor, evidenciado pela redução da ativação de caspase 3 e pelo aumento da viabilidade neuronal. Um estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisa LabNq, testou a atividade da apigenina (10 μ M)

em progenitores neurais e em células tronco humanas pluripotentes induzidas (CTPiH) e da mesma forma não revelou neurotoxicidade, notada pela redução da porcentagem de neurônios marcados para caspase 3 clivada (SOUZA *et al.*, 2015). Ainda, corroborando com os achados deste trabalho, um estudo recente, utilizando como modelo CTPiH de DA familiar e esporádica, revelou que os neurônios DA derivados de CTPiH exibiram aumento da apoptose e redução do comprimento dos neuritos quando comparado ao controle, e demonstrou que o tratamento com a apigenina (50 μ M) por 24 h foi capaz proteger os neurônios derivados de CTPiH, por redução significativa da apoptose mediada por caspase-3/7 (BALEZ *et al.*, 2016). Ademais, estudo realizado por Khan e colaboradores (2016) analisou o efeito neuroprotetor de antocianinas (24 mg/kg por 14 dias) em cultura de córtex de camundongo submetidas à neurodegeneração induzidas por LPS (250 μ g/kg). A análise por imunohistoquímica marcada para FJB demonstrou que o tratamento com antocianinas atenuou o número de neurônios FJB positivos.

A ativação glial é um mecanismo protetor que regula o reparo tecidual na fase inicial da neurodegeneração (STREIT, 2005). Entretanto, a ativação excessiva e prolongada contribui para resposta neuroinflamatória crônica (KRAFT & HARRY, 2011). No caso da DA, evidências sugerem que a ativação sustentada de microglias e astrócitos, inicialmente provocada por oligômeros A β , desencadeia uma resposta neuroinflamatória crônica que é em parte caracterizada pela produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, as quais perpetuam a ativação glial e conseqüentemente contribuem para a progressão da neurodegeneração (HENEKA *et al.*, 2015; STEWART *et al.*, 2010). Estes dados reforçam a hipótese de que o uso de agentes anti-inflamatórios pode retardar a progressão desta patologia (DANIELS *et al.*, 2016).

Neste sentido, a apigenina por demonstrar potencial anti-inflamatório e neuroprotetor, apresenta-se como um composto promissor para estudos direcionados ao desenvolvimento de novos tratamentos de doenças neurodegenerativas, como a DA (ANUSHA *et al.*, 2017; BALEZ *et al.*, 2016).

Diferentes estímulos no SNC podem induzir ativação, proliferação e mudanças na morfologia e função das microglias, que podem ser moduladas por agentes anti-inflamatórios, a exemplo da flavona luteolina, que se mostrou capaz de promover em linhagens de microgliais (BV2) expostas ao LPS mudança da morfologia amebóide, para morfologia ramificada. Esta modificação na morfologia também foi associada à inibição da síntese de NO e da expressão de RNAm de IL6, favorecendo o fenótipo

M2, com características anti-inflamatórias e neuroprotetoras (DIRSCHERL *et al.*, 2010). Os achados encontrados neste trabalho foram similares a esse estudo, levando em consideração que o estado de ativação e o fenótipo da microglia podem ser refletidos pela sua forma celular (TANG & LE, 2016; VINET *et al.*, 2012), foi demonstrado que a apigenina atua como modulador do perfil microglial, uma vez que, após resposta inflamatória induzida, o tratamento com apigenina gerou mudança morfológica da microglia de estado ameboide para ramificado.

As mudanças dinâmicas dos fenótipos microgliais estão associadas às doenças neurodegenerativas, sendo amplamente aceita a dicotomia dos perfis microgliais M1/M2, onde tais microglia podem exercer funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, respectivamente (TANG & LE, 2016). Como já descrito, o LPS (KOBAYASHI *et al.*, 2013) e os oligômeros A β (MAEZAWA *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2016; TAIPA *et al.*, 2017), são potentes indutores da expressão de marcadores pró-inflamatórios e da ativação, como proliferação (identificada pela incorporação de BrdU) e polarização do perfil microglial M1, caracterizado pela expressão do marcador CD68. Neste trabalho observou-se que a apigenina foi capaz de diminuir a porcentagem de microglia CD68 e BrdU positivas após estímulo neuroinflamatório.

Levando em consideração que as microglia e os macrófagos são derivados da linhagem mielóide (HERZ *et al.*, 2017), Karamese e colaboradores (2016) demonstraram em modelo experimental de sepse polimicrobiana em ratos, induzida por ligadura e perfuração cecal, um aumento significativo dos níveis de linfócitos T, macrófagos (CD68 positivos) e de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, o tratamento com a apigenina (20, 40 e 60 mg/kg via intragástrica) 24h antes da indução da sepse, foi capaz de reduzir o número destas células e conseqüentemente atenuar o processo inflamatório observado no baço destes animais.

Elsisi e colaboradores (2005) conduziram outro estudo investigando os efeitos do ibuprofeno (anti-inflamatório não-esteróide) e da apigenina sobre o ciclo celular de linhagem microglial BV-2. Os achados indicaram que a parada do ciclo celular induzida pela apigenina, foi preferencialmente na fase G2/M do ciclo celular e que, tanto o apigenina, como o ibuprofeno induziram apoptose nos estágios precoce e tardio. Por conseguinte, os resultados deste estudo sugerem que compostos anti-inflamatórios podem inibir a proliferação microglial pela modulação da progressão do ciclo celular e apoptose.

Assim como as células microgliais, os astrócitos respondem à injúria no SNC, possuem papel importante na neuroinflamação, no comprometimento da homeostase e na disfunção sináptica observada na DA (VERKHRATSKY *et al.*, 2010). Ledo e colaboradores (2013) observaram após injeção intracerebroventricular de oligômeros A β (10 pmol) em camundongos, aumento da imunoreatividade astrocitária à GFAP no hipocampo e no córtex desses animais, além de aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, os diferentes estímulos inflamatórios induziram alterações na morfologia astrocitária. No entanto, após o tratamento com apigenina não foram visualizadas características morfológicas de astrogliose. Corroborando com os resultados deste trabalho, Zuiki e colaboradores (2017) demonstraram em modelo de ativação imune materna (AIM) utilizando CTPiH expostas à IL6 (100 ng/mL), um aumento significativo da proporção da área de astrócitos (proporção da área GFAP positiva) e atenuação da astrogliose após tratamento com luteolina (10 e 20 μ M), além de efeito neuroprotetor. Sugerindo que a luteolina pode atenuar as anormalidades induzidas por AIM durante o desenvolvimento fetal.

O presente estudo reafirma o potencial imunomodulador da apigenina e a redução da neuroinflamação induzida por IL1 β , observada através da regulação negativa da expressão de RNAm de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL6 e CCL5), além da regulação positiva da expressão de RNAm da citocina regulatória IL10. Recentemente, Zhang e colaboradores (2015) demonstraram em modelo experimental de lesão cerebral seguido de hemorragia subaracnóidea o efeito anti-inflamatório da apigenina (20 mg/kg i.p). Segundo os autores a apigenina suprimiu a ativação da via de sinalização TLR4/NF- κ B em neurônios, microglias e células endoteliais e conseqüentemente foi capaz de reduzir a expressão RNAm de IL-6, IL1 β e TNF- α , atenuando a neuroinflamação e o rompimento da BHE.

Zhang, X. e colaboradores (2014) também demonstraram que a apigenina (25 μ M) foi capaz de inibir a produção de IL-6, IL-1 β e CCL5 por macrófagos humanos (THP-1) e de camundongos (J774A.1) ativados por LPS (100 ng/mL) através da modulação das vias de sinalização intracelular como proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), por meio da supressão da fosforilação de ERK1/2 e bloqueio da ativação de NF- κ B em linhagem derivada de células de rim embrionário humano (HEK 239), previamente tratadas com IL-1 β (10 ng/mL) e TNF- α (10 ng/mL). Os mesmos autores revelaram que a apigenina suprimiu a produção de IL-1 β através do bloqueio da ativação da caspase-1 e interrupção da montagem do complexo inflamassoma

NLRP3. Além disso, observaram que a regulação negativa de IL-10 por LPS foi revertida pela apigenina. Sugerindo que o flavonoide pode modular a resposta inflamatória através de múltiplos mecanismos.

Segundo Halle e colaboradores (2008) a ativação do inflamassoma NLRP3, está intimamente associada à ativação de caspase 1 e liberação de IL-1 β por microglias expostas ao A β . Em estudo mais recente, Dempsey e colaboradores (2017) analisaram o efeito de pequenas moléculas inibidoras do NLRP3, denominadas de MCC950, em culturas de microglia. As culturas foram pré-incubadas por 4 h com LPS (1 μ g/mL) e, ao fim da exposição, foi adicionada MCC950 (100 nM) durante 30 min, seguida da adição de A β (10 μ M) durante 24 h. A MCC950 inibiu a ativação de caspase 1, estimulou a fagocitose de A β e reduziu a expressão de IL1 β *in vitro*. O mesmo estudo demonstrou, em modelo *in vivo* utilizando camundongos 2xTg-DA, que a MCC950 (10 mg/kg) também inibiu a ativação do NLRP3 e da microglia, bem como reduziu o acúmulo de A β . Juntos, estes dados sugerem que o acúmulo de A β pode ser mediado pela formação do complexo inflamassoma.

As neurotrofinas (NTFs) são proteínas que promovem a diferenciação e sobrevivência neuronal (JOSEPHY-HERNANDEZ *et al.*, 2017). A exemplo, o BDNF e NTF4 que se acoplam aos receptores tirosina-quinase TrkB e TrkC, codificados pelos genes NTRK2 e NTRK3, respectivamente. São responsáveis pela regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência de neurônios e possuem um papel essencial no desenvolvimento e manutenção do SNC (BOULLE *et al.*, 2012; KAPLAN & MILLER, 2000; BOTHWELL, 2016). A ligação de agonista aos receptores Trks leva à ativação da atividade enzimática do receptor tirosina quinase e à fosforilação de proteínas em locais onde substratos intracelulares, tais como PLC γ , PI3K, Ras e Erk1 podem promover cascatas de sinalização. Essas cascatas são geralmente associadas ao desenvolvimento, sobrevivência, manutenção e função neuronal (JOSEPHY-HERNANDEZ *et al.*, 2017).

Os efeitos do BDNF são atribuídos à ativação do receptor TrkB que transduz o sinal através da via Ras-ERK, PI3K e PLC γ (HUANG & REICHARDT, 2001; MOWLA *et al.*, 2001). Sabe-se que o BDNF é secretado por neurônios e células gliais e está vastamente distribuído no SNC (MURER *et al.*, 2001; PARK & POO, 2013), sendo então capaz de induzir a transcrição de genes associados com a sobrevivência neuronal. Além disso, o BDNF é responsável pela plasticidade sináptica, crescimento

neuronal, bem como proliferação e diferenciação de células-tronco neurais (LI *et al.*, 2017; MOWLA *et al.*, 2001).

Segundo Tong e colaboradores (2008), a IL-1 β interfere na sinalização do BDNF por suprimir a ativação das vias de transdução de sinal (PI3-K/Akt e MAPK/ERK) e do fator de transcrição de gene (CREB) que está associado com sobrevivência neuronal. Assim, a IL1 β torna os neurônios vulneráveis à degeneração ao interferir com a neuroproteção induzida por BDNF. Esta neurotrofina também apresenta um papel crítico na fisiopatologia da DA, na qual é observada neuroinflamação, que em parte é caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL1 β . Zhang, C. e colaboradores (2014) mostraram que a desregulação das vias de sinalização do BDNF, correlaciona-se com perda sináptica e disfunção celular subjacente ao comprometimento cognitivo na DA.

Os resultados obtidos neste trabalho, revelaram que os níveis de RNAm de BDNF em co-culturas de neurônios e células gliais foram reduzidos após indução de neuroinflamação com IL1 β , e que o tratamento com apigenina foi capaz de reverter este efeito. Estes achados reafirmam o efeito neuroprotetor da apigenina, conforme descrito por Zhao e colaboradores (2013) que demonstrou aumento dos níveis de BDNF, da expressão de ERK1/2 e CREB e restabelecimento dos déficits de aprendizagem e da função cognitiva de ratos 2xTg-DA tratados com apigenina (40 mg/kg, via oral). Weng e colaboradores (2016) em trabalho mais recente, demonstraram que a apigenina (20 e 40 mg/kg) reverteu o comportamento depressivo em ratos que foram submetidos ao tratamento crônico com corticosterona. Somado a estes achados, a administração de apigenina foi capaz de elevar os níveis de BDNF nesta condição.

As doenças neurodegenerativas geralmente apresentam um desequilíbrio de neurotrofinas, o que pode resultar na redução da sinalização trófica através dos receptores Trk (JOSEPHY-HERNANDEZ *et al.*, 2017). Embora neste trabalho não tenha sido observado aumento da expressão de NTF4 após indução de neuroinflamação, assim como após tratamento com apigenina, foi observado aumento nos níveis de expressão do BDNF, quando comparado ao dano com IL1 β . Como já comentado, diferentes abordagens podem ser utilizadas a fim de reestabelecer a homeostasia do SNC, e o aumento de uma dessas NTFs associado a outros mecanismos de proteção como o efeito anti-inflamatório, visto após o tratamento com

apigenina, podem desempenhar um papel fundamental no tratamento de distúrbios neurológicos.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a apigenina na concentração de 1 μ M apresenta potencial neuroprotetor, anti-inflamatório e imunomodulador da resposta glial demonstrados em diferentes modelos de neuroinflamação. Foi observada resposta inflamatória exacerbada frente a diferentes estímulos, que foi caracterizada pela expressão de citocinas e quimiocinas próinflamatórias (IL6, IL1 β e CCL5), proliferação microglial, polarização para perfil microglial M1 e astrogliose. Portanto, sugerimos que esta neuroinflamação tenha conduzido a uma neurodegeneração, que foi atenuada pelo aumento dos níveis de BDNF e pela modulação da resposta neuroinflamatória em consequência do tratamento com apigenina. Por fim, este é o primeiro relato da interação do flavonoide apigenina em co-cultura de neurônios e células gliais submetidas ao dano com IL1 β , correlacionando com a DA.

Por fim, mais estudos são necessários a fim de elucidar os mecanismos neuroprotetores da apigenina nestes modelos de neuroinflamação.

8 CONCLUSÃO

Com base no conjunto de resultados obtidos neste trabalho de dissertação de mestrado, concluímos que:

- Co-culturas de neurônios e células gliais expostas à LPS, IL1 β ou A β constituem bons modelos de estudo *in vitro* para neuroinflamação característica da doença de Alzheimer.
- A apigenina constitui um agente com potencial neuroprotetor, por ser capaz de reduzir o número de células caspase 3 positivas, reduzir o número de neurônios em degeneração e aumentar a expressão do fator neurotrófico BDNF.
- A apigenina possui potencial anti-inflamatório caracterizado pela redução da expressão dos mediadores pró-inflamatórios, IL6 e CCL5 e aumento da expressão da citocina regulatória IL10.
- A apigenina apresenta potencial imunomodulador da resposta glial frente a diferentes estímulos neuroinflamatórios.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, C.; ANDERSON, H. D.; ANDERSON, C. M. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. **J Neurosci Res**, May 03 2017. ISSN 0360-4012.
- AGATI, G. et al. The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. **J Plant Physiol**, v. 168, n. 3, p. 204-12, Feb 15 2011. ISSN 0176-1617.
- AL-ALI, H. et al. In vitro models of axon regeneration. **Exp Neurol**, v. 287, n. Pt 3, p. 423-434, Jan 2017. ISSN 0014-4886.
- ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. In: (Ed.). **Nature**. England, v.457, 2009. p.675-7. ISBN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 165-79, Nov 2001. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491.
- ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 2, p. 155-67, Feb 2010. ISSN 0022-3069.
- ANUSHA, C.; SUMATHI, T.; JOSEPH, L. D. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. **Chem Biol Interact**, v. 269, p. 67-79, May 01 2017. ISSN 0009-2797.
- AZIZI, G.; MIRSHAFIEY, A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 34, n. 6, p. 881-95, Dec 2012. ISSN 0892-3973.
- BALEZ, R. et al. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. **Sci Rep**, v. 6, p. 31450, Aug 12 2016. ISSN 2045-2322.
- BANERJEE, S.; BHAT, M. A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 235-58, 2007. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006x.
- BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 39, n. 1, p. 3-18, Feb 2013. ISSN 0305-1846.
- BOTHWELL, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402 (Print) 2046-1402.

BOULLE, F. et al. TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. **Prog Neurobiol**, v. 98, n. 2, p. 197-206, Aug 2012. ISSN 0301-0082.

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.

CAPRNDA, M. et al. Immunomodulatory effects of stem cells: Therapeutic option for neurodegenerative disorders. **Biomed Pharmacother**, v. 91, p. 60-69, Jul 2017. ISSN 0753-3322.

CARRERO, I. et al. Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. **Exp Neurol**, v. 236, n. 2, p. 215-27, Aug 2012. ISSN 0014-4886.

CHEN, J. et al. Inhibition of AGEs/RAGE/Rho/ROCK pathway suppresses non-specific neuroinflammation by regulating BV2 microglial M1/M2 polarization through the NF-kappaB pathway. **J Neuroimmunol**, v. 305, p. 108-114, Apr 15 2017. ISSN 0165-5728.

CHOI, J. S. et al. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food Chem Toxicol**, v. 64, p. 27-33, Feb 2014. ISSN 0278-6915.

CHOI, S. M. et al. Effects of Flavonoid Compounds on beta-amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. **Chonnam Med J**, v. 50, n. 2, p. 45-51, Aug 2014. ISSN 2233-7385 (Print) 2233-7393.

COELHO, P. L. et al. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. **Anticancer Drugs**, v. 27, n. 10, p. 960-9, Nov 2016. ISSN 0959-4973.

COELHO, P. L. C. et al. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 34-43, 2016. ISSN 0102-695X.

COLOVIC, M. B. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Curr Neuropharmacol**, v. 11, n. 3, p. 315-35, May 2013. ISSN 1570-159X (Print) 1570-159x.

COMBES, V. et al. The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 8, p. 311-9, Aug 2012. ISSN 1471-4922.

D'ARCHIVIO, M. et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 4, p. 1321-42, Mar 31 2010. ISSN 1422-0067.

DA ROCHA, M. D. et al. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 2, p. 251-70, Mar 2011. ISSN 1871-5273.

DANIELS, M. J. et al. Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. **Nat Commun**, v. 7, p. 12504, Aug 11 2016. ISSN 2041-1723.

DE FELICE, F. G. et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 9, p. 1334-47, Sep 2008. ISSN 0197-4580.

DE LUCIA, C. et al. Microglia regulate hippocampal neurogenesis during chronic neurodegeneration. **Brain Behav Immun**, v. 55, p. 179-90, Jul 2016. ISSN 0889-1591.

DE VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. **J Chromatogr A**, v. 1430, p. 16-78, Jan 22 2016. ISSN 0021-9673.

DEL RIO, D. et al. Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. **Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 528-33, May 2010. ISSN 0899-9007.

DEMPSEY, C. et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-beta and cognitive function in APP/PS1 mice. **Brain Behav Immun**, v. 61, p. 306-316, Mar 2017. ISSN 0889-1591.

DENG, J. et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **J Ethnopharmacol**, v. 128, n. 1, p. 148-53, Mar 02 2010. ISSN 0378-8741.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **J Ethnopharmacol**, v. 78, n. 2-3, p. 165-70, Dec 2001. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n. 4, p. 461-91, 2013. ISSN 1877-7171.

DIRSCHERL, K. et al. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 3, Jan 14 2010. ISSN 1742-2094.

DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Res Bull**, Feb 13 2017. ISSN 0361-9230.

DOTY, K. R.; GUILLOT-SESTIER, M. V.; TOWN, T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? **Brain Res**, v. 1617, p. 155-73, Aug 18 2015. ISSN 0006-8993.

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

ELSISI, N. S. et al. Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. **Neurosci Lett**, v. 375, n. 2, p. 91-6, Feb 28 2005. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Curr Neuropharmacol**, v. 14, n. 1, p. 101-15, 2016. ISSN 1570-159x.

FERRI, P. et al. Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with alpha-tocopherol. **Food Funct**, v. 6, n. 2, p. 394-400, Feb 2015. ISSN 2042-6496.

FUNFSCHILLING, U. et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. **Nature**, v. 485, n. 7399, p. 517-21, Apr 29 2012. ISSN 0028-0836.

GAZOLA, A. C. et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 158-163, 2015. ISSN 0102-695X.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 120, n. 3, p. 885-90, May 16 1984. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

GOLDEN, T. R.; HINERFELD, D. A.; MELOV, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. **Aging Cell**, v. 1, n. 2, p. 117-23, Dec 2002. ISSN 1474-9718 (Print) 1474-9718.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, p. 61-84, 2013. ISSN 0103-4014.

GRAEFE, E. U. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **J Clin Pharmacol**, v. 41, n. 5, p. 492-9, May 2001. ISSN 0091-2700 (Print) 0091-2700.

GRALLE, M.; FERREIRA, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. **Prog Neurobiol**, v. 82, n. 1, p. 11-32, May 2007. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.

GUILLOT-SESTIER, M. V.; TOWN, T. Innate immunity in Alzheimer's disease: a complex affair. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 593-607, Aug 2013. ISSN 1871-5273.

GUPTA, S. et al. Discovery of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors identified by pharmacophore modeling and sequential virtual screening techniques. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 4, p. 1105-12, Feb 15 2011. ISSN 0960-894x.

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.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 857-65, Aug 2008. ISSN 1529-2908.

HAN, J. Y. et al. Protection of apigenin against kainate-induced excitotoxicity by anti-oxidative effects. **Biol Pharm Bull**, v. 35, n. 9, p. 1440-6, 2012. ISSN 0918-6158.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec 2002. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258.

HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 4, p. 388-405, Apr 2015. ISSN 1474-4422.

HENEKA, M.T. et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. 674-8, Jan 31 2013. ISSN 0028-0836.

HERZ, J. et al. Myeloid Cells in the Central Nervous System. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 943-956, Jun 20 2017. ISSN 1074-7613.

HOLLMAN, P. C. et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS Lett**, v. 418, n. 1-2, p. 152-6, Nov 24 1997. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 677-736, 2001. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006x.

HUANG, W. C. et al. TGF-beta1 blockade of microglial chemotaxis toward Abeta aggregates involves SMAD signaling and down-regulation of CCL5. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 28, Apr 29 2010. ISSN 1742-2094.

HUANG, Y. L. et al. Anti-inflammatory and Antiosteoporosis Flavonoids from the Rhizomes of *Helminthostachys zeylanica*. **J Nat Prod**, v. 80, n. 2, p. 246-253, Feb 24 2017. ISSN 0163-3864.

JEONG, E. J. et al. Neuroprotective biflavonoids of *Chamaecyparis obtusa* leaves against glutamate-induced oxidative stress in HT22 hippocampal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 397-402, 2// 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151300817X> >.

JOSEPHY-HERNANDEZ, S. et al. Neurotrophin receptor agonists and antagonists as therapeutic agents: An evolving paradigm. **Neurobiol Dis**, v. 97, n. Pt B, p. 139-155, Jan 2017. ISSN 0969-9961.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, n. 3, p. 381-91, Jun 2000. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388.

KARAMESE, M. et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of apigenin in a rat model of sepsis: an immunological, biochemical, and histopathological study. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 38, n. 3, p. 228-37, Jun 2016. ISSN 0892-3973.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **J Neurol Neurosurg Spine**, v. 1, n. 1, 2016.

KHAN, M. S. et al. Anthocyanins protect against LPS-induced oxidative stress-mediated neuroinflammation and neurodegeneration in the adult mouse cortex. **Neurochem Int**, v. 100, p. 1-10, Nov 2016. ISSN 0197-0186.

KIM, S.; CHIN, Y. W.; CHO, J. Protection of Cultured Cortical Neurons by Luteolin against Oxidative Damage through Inhibition of Apoptosis and Induction of Heme Oxygenase-1. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 3, p. 256-265, 2017. ISSN 0918-6158.

KITAZAWA, M. et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. **J Immunol**, v. 187, n. 12, p. 6539-49, Dec 15 2011. ISSN 0022-1767.

KLEIN, N. et al. Assessment of sedative effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* extracts in mice, measured by telemetry. **Phytother Res**, v. 28, n. 5, p. 706-13, May 2014. ISSN 0951-418x.

KOBAYASHI, K. et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e525, Mar 07 2013.

KOLAROVA, M. et al. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2012, p. 731526, 2012.

KRAFT, A. D.; HARRY, G. J. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 7, p. 2980-3018, Jul 2011. ISSN 1660-4601.

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

LANI, R. et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50-61, 9// 2016. ISSN 0166-3542. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354216301978>>.

LANOISELEE, H. M. et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. **PLoS Med**, v. 14, n. 3, p. e1002270, Mar 2017. ISSN 1549-1277.

LEDO, J. H. et al. Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. In: (Ed.). **Mol Psychiatry**. England, v.18, 2013. p.1053-4. ISBN 1476-5578 (Electronic) 1359-4184 (Linking).

LEE, J. A. et al. Resveratrol as a Bioenhancer to Improve Anti-Inflammatory Activities of Apigenin. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9650-61, Nov 19 2015. ISSN 2072-6643.

LEEM, E. et al. Naringin protects the nigrostriatal dopaminergic projection through induction of GDNF in a neurotoxin model of Parkinson's disease. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 7, p. 801-6, Jul 2014. ISSN 0955-2863.

LEONG, S. Y. et al. Properties of human central nervous system neurons in a glia-depleted (isolated) culture system. **J Neurosci Methods**, v. 253, p. 142-50, Sep 30 2015. ISSN 0165-0270.

LI, X. T. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes growth of neurons and neural stem cells possibly by triggering the phosphoinositide 3-kinase /AKT/ glycogen synthase kinase-3beta /beta-catenin pathway. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, May 18 2017. ISSN 1871-5273.

LIU, R. et al. The flavonoid apigenin protects brain neurovascular coupling against amyloid-beta(2)(5)(-)(3)(5)-induced toxicity in mice. **J Alzheimers Dis**, v. 24, n. 1, p. 85-100, 2011. ISSN 1387-2877.

LOPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 4, p. 495-506, Aug 15 2008. ISSN 0006-2952.

LOURENCO, M. V. et al. TNF-alpha mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's beta-amyloid oligomers in mice and monkeys. **Cell Metab**, v. 18, n. 6, p. 831-43, Dec 03 2013. ISSN 1550-4131.

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.

MAEZAWA, I. et al. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 5, p. 3693-706, Feb 04 2011. ISSN 0021-9258.

MAGALINGAM, K. B.; RADHAKRISHNAN, A.; HALEAGRAHARA, N. Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. **Int J Mol Med**, v. 32, n. 1, p. 235-40, Jul 2013. ISSN 1107-3756.

MASSOUD, F.; LEGER, G. C. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. **Can J Psychiatry**, v. 56, n. 10, p. 579-88, Oct 2011. ISSN 0706-7437.

MASTERS, C. L. et al. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. **Embo j**, v. 4, n. 11, p. 2757-63, Nov 1985. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

MATOS, M. et al. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 898-910, Oct 28 2008. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytother Res**, v. 20, n. 7, p. 519-30, Jul 2006. ISSN 0951-418X (Print) 0951-418x.

MEYER, K.; KASPAR, B. K. Glia-neuron interactions in neurological diseases: Testing non-cell autonomy in a dish. **Brain Res**, v. 1656, p. 27-39, Feb 01 2017. ISSN 0006-8993.

MORAES, C. A. et al. Activated Microglia-Induced Deficits in Excitatory Synapses Through IL-1beta: Implications for Cognitive Impairment in Sepsis. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 1, p. 653-63, Aug 2015. ISSN 0893-7648.

MORI, T. et al. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **Glia**, v. 58, n. 3, p. 300-14, Feb 2010. ISSN 0894-1491.

MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 624-628, 2012. ISSN 1516-0572.

MOWLA, S. J. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 12660-6, Apr 20 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

- MUCKE, L. et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **J Neurosci**, v. 20, n. 11, p. 4050-8, Jun 01 2000. ISSN 0270-6474.
- MULLEN, W.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. **Br J Nutr**, v. 96, n. 1, p. 107-16, Jul 2006. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145.
- MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 63, n. 1, p. 71-124, Jan 2001. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082.
- NADKARNI, S.; JUNG, P.; LEVINE, H. Astrocytes optimize the synaptic transmission of information. **PLoS Comput Biol**, v. 4, n. 5, p. e1000088, May 30 2008. ISSN 1553-734x.
- NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacol Ther**, v. 154, p. 21-35, Oct 2015. ISSN 0163-7258.
- NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Microglia development and function. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 367-402, 2014. ISSN 0732-0582.
- 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.
- NOBILI, A. et al. Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. **Nat Commun**, v. 8, p. 14727, Apr 03 2017. ISSN 2041-1723.
- PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, Jan 2013. ISSN 1471-003x.
- PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology. **J Neurochem**, v. 121, n. 1, p. 4-27, Apr 2012. ISSN 0022-3042.
- PATEL, D.; SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). **Int J Oncol**, v. 30, n. 1, p. 233-45, Jan 2007. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439.
- PIIRAINEN, S. et al. Psychosocial stress on neuroinflammation and cognitive dysfunctions in Alzheimer's disease: the emerging role for microglia? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 77, p. 148-164, Jun 2017. ISSN 0149-7634.

PITANGA, B. P. et al. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 6, p. 776-84, Dec 2011. ISSN 0161-813x.

POPOVIC, M. et al. The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 5, p. 498-501, May 2014. ISSN 0269-8811.

PROCACCINI, C. et al. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. **Metabolism**, v. 65, n. 9, p. 1376-90, Sep 2016. ISSN 0026-0495.

RADESATER, A. C. et al. The vitamin-E analog trolox and the NMDA antagonist MK-801 protect pyramidal neurons in hippocampal slice cultures from IL-1beta-induced neurodegeneration. **Neurotox Res**, v. 5, n. 6, p. 433-42, 2003. ISSN 1029-8428 (Print)
1029-8428.

RAZA, S. S. et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-kappaB signaling pathway in experimental stroke. **Neuroscience**, v. 230, p. 157-71, Jan 29 2013. ISSN 0306-4522.

Relatório Organização Mundial de Saúde (OMS) 2012: Demência - uma prioridade de saúde pública. Disponível no site: <http://www.alz.co.uk/WHO-dementia-report>
Acesso em: Maio/2017.

RIBEIRO, D. et al. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 858-70, Apr 2015. ISSN 0360-3997.

SABOGAL-GUAQUETA, A. M. et al. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, v. 93, p. 134-45, Jun 2015. ISSN 0028-3908.

SABRI, O. et al. Florbetaben PET imaging to detect amyloid beta plaques in Alzheimer's disease: phase 3 study. **Alzheimers Dement**, v. 11, n. 8, p. 964-74, Aug 2015. ISSN 1552-5260.

SANABRIA-CASTRO, A.; ALVARADO-ECHEVERRIA, I.; MONGE-BONILLA, C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. **Ann Neurosci**, v. 24, n. 1, p. 46-54, May 2017. ISSN 0972-7531 (Print)
0972-7531.

SANTOS, A. N. et al. Amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 29, n. 1, p. 171-6, 2012. ISSN 1387-2877.

SCALBERT, A. et al. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 6, p. 276-82, Aug 2002. ISSN 0753-3322 (Print)

0753-3322.

SCHINELLA, G. et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1614-1623, 7// 2010. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691000150X> >.

SCHMUCK, G.; KAHL, R. The use of Fluoro-Jade in primary neuronal cell cultures. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 4, p. 397-403, Apr 2009. ISSN 0340-5761.

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

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 741-66, Apr 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, p. 0-0, 2008. ISSN 0101-8108.

SHAMPO, M. A.; KYLE, R. A.; STEENSMA, D. P. Alois Alzheimer--Alzheimer disease. **Mayo Clin Proc**, v. 88, n. 12, p. e155, Dec 2013. ISSN 0025-6196.

SHAN, M. et al. TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon-beta (TRIF) Is Essential for MPTP-Induced Dopaminergic Neuroprotection via Microglial Cell M1/M2 Modulation. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 35, 2017. ISSN 1662-5102.

SHEEDY, F. J. et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. **Nat Immunol**, v. 14, n. 8, p. 812-20, Aug 2013. ISSN 1529-2908.

SHEN, R. et al. A natural flavonoid glucoside icariin inhibits Th1 and Th17 cell differentiation and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int Immunopharmacol**, v. 24, n. 2, p. 224-31, Feb 2015. ISSN 1567-5769.

SHI, X. et al. MFG-E8 Selectively Inhibited Abeta-Induced Microglial M1 Polarization via NF-kappaB and PI3K-Akt Pathways. **Mol Neurobiol**, Nov 14 2016. ISSN 0893-7648.

SILVA, V. D. et al. Juliprosopine and juliprosine from prosopis juliflora leaves induce mitochondrial damage and cytoplasmic vacuolation on cocultured glial cells and neurons. **Chem Res Toxicol**, v. 26, n. 12, p. 1810-20, Dec 16 2013. ISSN 0893-228x.

SILVA, V. D. A. et al. Autophagy protects against neural cell death induced by piperidine alkaloids present in Prosopis juliflora (Mesquite). **An Acad Bras Cienc**, v. 89, n. 1, p. 247-261, Jan-Mar 2017. ISSN 0001-3765.

- SIMONS, M.; NAVE, K. A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 1, p. a020479, Jun 22 2015. ISSN 1943-0264.
- SINGH, D. P.; CHOPRA, K. Flavocoxid, dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, exhibits neuroprotection in rat model of ischaemic stroke. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 120, p. 33-42, May 2014. ISSN 0091-3057.
- SNYDER, S. W. et al. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. **Biophys J**, v. 67, n. 3, p. 1216-28, Sep 1994. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 0001-6322.
- SONG, J.; CHOI, S. M.; KIM, B. C. Adiponectin Regulates the Polarization and Function of Microglia via PPAR-gamma Signaling Under Amyloid beta Toxicity. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 64, 2017. ISSN 1662-5102.
- SOUZA, C. S. et al. Commitment of human pluripotent stem cells to a neural lineage is induced by the pro-estrogenic flavonoid apigenin. **Advances in Regenerative Biology**, v. 2, n. 1, p. 29244, 2015/01/01 2015. ISSN null. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3402/arb.v2.29244>>.
- SRIVASTAVA, D. P.; WOOLFREY, K. M.; PENZES, P. Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 4, p. 1318-50, 2013. ISSN 0031-6997.
- SROKA, Z.; ZBIKOWSKA, B.; HLADYSZOWSKI, J. The antiradical activity of some selected flavones and flavonols. Experimental and quantum mechanical study. **J Mol Model**, v. 21, n. 12, p. 307, Dec 2015. ISSN 0948-5023.
- STEWART, C. R. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 155-61, Feb 2010. ISSN 1529-2908.
- STREIT, W. J. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, n. 2, p. 234-9, Apr 2005.
- SUN, L. O.; BARRES, B. A. Glia Get Neurons in Shape. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 775-6, May 05 2016. ISSN 0092-8674.
- SUTINEN, E. M. et al. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid-beta production in human neuron-like cells. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 199, Aug 16 2012. ISSN 1742-2094.
- SWARDFAGER, W. et al. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry**, v. 68, n. 10, p. 930-41, Nov 15 2010. ISSN 0006-3223.

- SZNEJDER-PACHOLEK, A. et al. The effect of alpha-synuclein on gliosis and IL-1alpha, TNFalpha, IFNgamma, TGFbeta expression in murine brain. **Pharmacol Rep**, v. 69, n. 2, p. 242-251, Apr 2017. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140.
- TAIPA, R. et al. Patterns of Microglial Cell Activation in Alzheimer Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. **Neurodegener Dis**, v. 17, n. 4-5, p. 145-154, Apr 27 2017. ISSN 1660-2854.
- TANG, Y.; LE, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 2, p. 1181-94, Mar 2016. ISSN 0893-7648.
- THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3367-87, Aug 28 2013. ISSN 2072-6643.
- THORED, P. et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, v. 57, n. 8, p. 835-49, Jun 2009. ISSN 0894-1491.
- TONG, L. et al. Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 9, p. 1380-93, Sep 2008. ISSN 0197-4580.
- TSUNEKAWA, T. et al. Deficiency of PTP1B Attenuates Hypothalamic Inflammation via Activation of the JAK2-STAT3 Pathway in Microglia. **EBioMedicine**, v. 16, p. 172-183, Feb 2017. ISSN 2352-3964.
- TU, S. et al. Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener**, v. 9, p. 48, Nov 14 2014. ISSN 1750-1326.
- VAN HORSSSEN, J.; VAN SCHAİK, P.; WITTE, M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? **Neurosci Lett**, Jun 28 2017. ISSN 0304-3940.
- VERKHRATSKY, A. et al. Astrocytes in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 399-412, Oct 2010. ISSN 1878-7479.
- VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004. ISSN 0100-4042.
- VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 1, p. 17-21, Jan 2005. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725.
- VILLET, S. et al. Open-label observational study of the homeopathic medicine Passiflora Compose for anxiety and sleep disorders. **Homeopathy**, v. 105, n. 1, p. 84-91, Feb 2016. ISSN 1475-4916.

VINET, J. et al. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 27, Jan 31 2012. ISSN 1742-2094.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1740-925x.

WALLIN, A. K.; WATTMO, C.; MINTHON, L. Galantamine treatment in Alzheimer's disease: response and long-term outcome in a routine clinical setting. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 7, p. 565-76, 2011. ISSN 1176-6328.

WALTER, S. et al. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Cell Physiol Biochem**, v. 20, n. 6, p. 947-56, 2007. ISSN 1015-8987 (Print) 1015-8987.

WANG, S. W. et al. Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 482-90, Jun 2012. ISSN 0161-813x.

WEGGEN, S.; BEHER, D. Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**, v. 4, n. 2, p. 9, Mar 30 2012.

WENG, L. et al. Apigenin reverses depression-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 774, p. 50-4, Mar 05 2016. ISSN 0014-2999.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M. J. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Nat Prod Rep**, v. 28, n. 1, p. 48-77, Jan 2011. ISSN 0265-0568.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Curr Opin Plant Biol**, v. 5, n. 3, p. 218-23, Jun 2002. ISSN 1369-5266 (Print) 1369-5266.

XIE, L. et al. Exploring the association between interleukin-1beta and its interacting proteins in Alzheimer's disease. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 5, p. 3219-28, May 2015. ISSN 1791-2997.

YANG, Q. et al. Protocol for culturing low density pure rat hippocampal neurons supported by mature mixed neuron cultures. **J Neurosci Methods**, v. 277, p. 38-45, Feb 01 2017. ISSN 0165-0270.

YANG, Y. et al. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 3, p. 388-96, Apr 2014. ISSN 0887-2333.

YIN, Z. et al. Immune hyperreactivity of Abeta plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 55, p. 115-122, Jul 2017. ISSN 0197-4580.

YOUDIM, K. A. et al. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. **J Neurochem**, v. 85, n. 1, p. 180-92, Apr 2003. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042.

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 11, p. 1683-93, Dec 01 2004. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

ZAND, R. S.; JENKINS, D. J.; DIAMANDIS, E. P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Res Treat**, v. 62, n. 1, p. 35-49, Jul 2000. ISSN 0167-6806 (Print) 0167-6806.

ZHANG, C. et al. RNA interference-mediated knockdown of long-form phosphodiesterase-4D (PDE4D) enzyme reverses amyloid-beta42-induced memory deficits in mice. **J Alzheimers Dis**, v. 38, n. 2, p. 269-80, 2014. ISSN 1387-2877.

ZHANG, F.; LI, F.; CHEN, G. Neuroprotective effect of apigenin in rats after contusive spinal cord injury. **Neurol Sci**, v. 35, n. 4, p. 583-8, Apr 2014. ISSN 1590-1874.

ZHANG, H. et al. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. **J Neurochem**, v. 120 Suppl 1, p. 9-21, Jan 2012. ISSN 0022-3042.

ZHANG, K. et al. Myricetin attenuated MPP(+)-induced cytotoxicity by anti-oxidation and inhibition of MKK4 and JNK activation in MES23.5 cells. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 1-2, p. 329-35, Jul-Aug 2011. ISSN 0028-3908.

ZHANG, T. et al. Apigenin protects blood-brain barrier and ameliorates early brain injury by inhibiting TLR4-mediated inflammatory pathway in subarachnoid hemorrhage rats. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 1, p. 79-87, Sep 2015. ISSN 1567-5769.

ZHANG, X. et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107072, 2014. ISSN 1932-6203.

ZHAO, L. et al. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9949-65, Aug 19 2013. ISSN 1420-3049.

ZHOU, K. et al. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 9238290, 2016. ISSN 2314-7156.

ZHOU, Y. J. et al. [Studies on the chemical constituents of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*]. **Zhong Yao Cai**, v. 32, n. 11, p. 1686-8, Nov 2009. ISSN 1001-4454 (Print)
1001-4454.

ZHU, S. et al. The role of neuroinflammation and amyloid in cognitive impairment in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **CNS Neurosci Ther**, v. 23, n. 4, p. 310-320, Apr 2017. ISSN 1755-5930.

ZOTOVA, E. et al. Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid-beta42 immunization. **Brain**, v. 136, n. Pt 9, p. 2677-96, Sep 2013. ISSN 0006-8950.

ZUIKI, M. et al. Luteolin attenuates interleukin-6-mediated astrogliosis in human iPSC-derived neural aggregates: A candidate preventive substance for maternal immune activation-induced abnormalities. **Neurosci Lett**, v. 653, p. 296-301, Jun 06 2017. ISSN 0304-3940.