



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



JÉSSICA TELES SOUZA

ESTUDO DO EFEITO DA RUTINA EM CÉLULAS NEURAIS
EM MODELO DE EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA

Salvador - BA

2020

JÉSSICA TELES SOUZA

**ESTUDO DO EFEITO DA RUTINA EM CÉLULAS NEURAIS
EM MODELO DE EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Coorientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira
Coorientador: Profa. Dra. Silvia Lima Costa

Salvador - BA

2020

JÉSSICA TELES SOUZA

**ESTUDO DO EFEITO DA RUTINA EM CÉLULAS NEURAIS
EM MODELO DE EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA**

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

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia, Brasil

Prof^a. Dr^a. Flávia Carla Meotti
Doutorado em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

Prof^a. Dr^a. Dra Clarissa de Sampaio Schitine
Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

A minha família,
Pelo apoio, força e amor.

Dedido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, força e sabedoria concedida durante esse percurso. Por ter me feito acreditar que tudo era possível.

Aos meus pais, Elza e Pinheiro, pelos ensinamentos, apoio incondicional e incentivo. Obrigada pela dedicação e auxílio, orações e suporte amoroso que me manteve em pé para seguir em frente. E aos meus irmãos, Denise e Daniel, melhores parceiros dessa vida e motivo de alegria e conforto nos momentos difíceis! Vocês são a razão da minha motivação e persistência!

À minha querida avó Catarina, pelas orações e pelos cuidados mesmo de longe. Aos meus tios, tias e primos pelo apoio, encorajamento e torcida.

Ao meu orientador, professor Dr. Victor Diogenes por todo conhecimento transmitido, pela paciência e ajuda sempre concedida. Sou grata por ter me acolhido como aluna, por ter acreditado que eu seria capaz e pelo respeito com que conduziu a orientação desse trabalho. Me orgulho muito de ser a sua aluna, um orientador humano e com um coração enorme!

As professoras Dr^a Silvia Lima Costa e Dr^a Fátima Dias Costa, que me acolheram no laboratório com tanto zelo. Agradeço pela disposição, pelas palavras encorajadoras e por nos instigarmos a ser melhores a cada dia. Tenho vocês como grandes exemplos de pesquisadoras!

A todos os colegas do LABNq pelas contribuições científicas e pela parceria na vida acadêmica. Sem vocês a concretização deste trabalho não seria possível. Obrigada a Cleo pelo conhecimento compartilhado, a Érica Novaes, Alana e Letícia pela ajuda e companheirismo desde o início do mestrado, a Rafael pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração no laboratório (mesmo quando nos obrigava a ouvir arrocha). A Ana Elisa e Deivison, sempre tão solícitos e dispostos a ajudar. A todas as meninas da Iniciação Científica que me ajudaram no desenvolvimento experimental, em especial a Flávia que esteve comigo nos momentos mais cansativos e a Ana e Brena. São muitas as pessoas deste laboratório que contribuíram direta e indiretamente para minha formação como cientista e pessoa (as vezes uma palavra gentil já fazia toda a diferença). Gostaria de poder citar todos vocês, mas não caberiam neste espaço... Sintam-se lembrados com muito carinho por mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia molecular (PMBqBM) pela dedicação. Em especial as professoras Dr^a Luzimar pelo incentivo e a Dr^a Simone Macambira pelo apoio, palavras de conforto e carinho.

Aos meus colegas do PMBqBM que foram mais que companheiros de turma! Especialmente a Thiago, quem tornou o meu trajeto neste mestrado mais divertido e leve (a quem eu recorria desde a graduação nos dias difíceis para pedir socorro, literalmente) e a Fernanda e Tayla, quem dividiu comigo tantos momentos de tensão e alegria.

Agradeço aos meus amigos Bruna, Fernando, Marcus e Priscila, pelos sorrisos arrancados durante os momentos mais difíceis dessa jornada. Eu não teria conseguido sem a amizade de vocês!

Por fim, agradeço a agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

TELES-SOUZA, Jessica. Estudo do efeito da rutina em células neurais em modelo de excitotoxicidade glutamatérgica. 76fl. 2020. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

RESUMO

A rutina é um dos compostos polifenólicos mais comuns descritos na literatura, com grande destaque no âmbito científico devido as suas inúmeras atividades farmacológicas de interesse à saúde humana, incluindo seu potencial neuroprotetor. No contexto das doenças neurodegenerativas, a excitotoxicidade glutamatérgica tem sido apontada como um importante mecanismo de morte neuronal associado a progressão dessas doenças. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a atividade neuroprotetora da rutina para células neurais sob ação citotóxica do glutamato. Para isso, foram realizadas culturas organotípicas de cérebro, cultura primária de neurônio/células gliais mesencefálicas e cultura de células da linhagem PC12. A cultura de células PC12 foi submetida a diferentes tratamentos: tratamento direto com a rutina (0,5 – 50 μM) e/ou glutamato (10 - 60 mM); tratamento indireto obtido com o uso de meio condicionado da cultura organotípica cerebral de rato Wistar (p7-p9) tratados com a rutina (0,5 μM) e glutamato (60 mM). Em adição, também tratamos cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas com rutina a 0,5 μM . Passadas 24 h dos tratamentos direto e indireto das células PC12, realizamos as análises de viabilidade celular utilizando o Teste de de Iodeto de Propídio. Além disto, realizamos análises morfológicas após coloração de Rosenfeld para as células PC12 e para a cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas. Os resultados obtidos com o teste de viabilidade celular demonstraram que a rutina não foi tóxica para as células PC12 até a concentração de 10 μM , por 24 h. O glutamato, por sua vez, induziu efeito tóxico para as células PC12 de maneira concentração-dependente, sendo que a concentração a 60 mM foi capaz de provocar aproximadamente 100% de morte para as células em cultivo. Em relação aos ensaios de neuroproteção direta, demonstrou-se que a rutina não foi capaz de proteger as células PC12 contra a toxicidade do glutamato a 30 e 60 mM, sendo essas concentrações tóxicas para 20% e 100% de morte, respectivamente. Por outro lado, o meio condicionado de cultura organotípica tratada com a rutina (0,5 μM) + glutamato (60 mM) induziu baixa toxicidade para células PC12, mais especificamente apenas 8% das células morreram com o tratamento, enquanto que o tratamento direto apresentou 100% de células mortas. Em relação as alterações morfológicas, o tratamento indireto com meio condicionado de tratamento com rutina induziu mudanças características de diferenciação neuronal para aproximadamente 26% das células em cultivo, diferente do tratamento direto com rutina o qual induziu 2.5%. Estas alterações morfológicas relacionadas ao aumento de pontos de ramificações e ao aumento do comprimento de neuritos também foram observadas em células PC12 sob tratamento indireto e cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas. Estes resultados indicam um efeito neuroprotetor e morfogênico da rutina que podem estar associados à modulação do metabolismo do glutamato pelos astrócitos e/ ou liberação de fatores solúveis neuroprotetores e indutores de diferenciação neural.

Palavras-chaves: Doenças neurodegenerativas; excitotoxicidade glutamatérgica; flavonoides; neuroproteção.

TELES-SOUZA, Jessica. Study of rutin effect in neural cells on a glutamatergic excitotoxicity model. 76fl. 2020. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

ABSTRACT

Rutin is one of the most common used polyphenolic compounds described in the literature, with great scientific prominence due to its interesting pharmacological activities for of human health, including its neuroprotective potential. In the context of neurodegenerative diseases, glutamatergic excitotoxicity has been identified as an important mechanism of neuronal death associated with progression of these diseases. Therefore, this study aimed to investigate the rutin neuroprotective activity for neural cells under cytotoxic glutamate action. For this, organotypic cultures of the brain, primary culture of neuron/ mesencephalic glial cells and culture of cells of the PC12 strain were performed. The PC12 cells culture was subjected to different treatments: direct treatment with rutin (0.5 - 50 μ M) and /or glutamate (10 - 60 mM); indirect treatment using conditioned medium obtained from brain organotypic culture of Wistar rats (p7-p9) treated with rutin (0.5 μ M) and glutamate (60 mM). In addition, we also treated primary culture of mesencephalic neurons/glial cells with 0.5 μ M rutin. After 24 hours of direct or indirect treatment of PC12 cells, we performed cell viability analyzes by Propidium Iodide test. In addition, we performed morphological analyzes after Rosenfeld staining for PC12 cells and for primary culture of mesencephalic neurons/glial cells. The results obtained with the cell viability test demonstrated that rutin was not toxic to PC12 cells 10 μ M, for 24 h. Glutamate, in turn, induced a toxic effect in PC12 cells in a concentration-dependent manner, and the concentration at 60 mM was able to cause almost 100% of death to the cells in culture. In relation to direct neuroprotection assays, it was demonstrated that rutin was not able to protect PC12 cells against glutamate toxicity at 30 and 60 mM, these concentrations being toxic to 20% and 100% death, respectively. On the other hand, conditioned media from brain organotypic culture treated with rutin- (0.5 μ M) + glutamate (60 mM) induced low toxicity in PC12 cultures, more specifically only 8% of cells died with treatment, whereas direct treatment presented 100% dead cells. Regarding morphological changes, indirect treatment with rutin induced a characteristic change in neuronal differentiation for approximately 26% of cells in culture, unlike direct treatment which induced 2.5%. These morphological changes related to the increase of branch points and the increase of neurite length were observed in PC12 cells and in primary culture of mesencephalic neurons/glial cells. These results indicate that the neuroprotective and morphogenic effects of rutin may be associated with modulation of glutamate metabolism by astrocytes and/ or release of soluble neuroprotective and inductors of neural differentiation factors.

Keywords: Flavonoids; glutamatergic excitotoxicity; neurodegenerative diseases; neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Os principais tipos celulares do Sistema Nervoso Central (SNC)	18
FIGURA 2: Representação esquemática do processo excitotóxico resultante do excesso de glutamato.	21
FIGURA 3: Região mesencefálica evidenciando perda celular progressiva na Substancia Nigra Pars Compacta (SNPc) associada a Doença de Parkinson	27
FIGURA 4: Estrutura química do flavonoide rutina	31
FIGURA 5: Desenho experimental	35
FIGURA 6: Avaliação do efeito das diferentes concentrações da rutina para a viabilidade de células PC12.	42
FIGURA 7: Avaliação do efeito das diferentes concentrações do glutamato para a viabilidade de células PC12	44
FIGURA 8: Avaliação morfológica das células PC12 após ensaio de lesão com o glutamato.	46
FIGURA 9: Análise do efeito neuroprotetor direto da rutina contra a toxicidade do glutamato para células PC12	47
FIGURA 10: Análise morfológica da cultura de célula PC12 após 24 h do ensaio de neuroproteção da rutina contra toxicidade do glutamato.....	50
FIGURA 11: Análise do comprimento médio de neuritos das células PC12 após 24 h do ensaio de neuroproteção da rutina contra toxicidade do glutamato..	51
FIGURA 12: Avaliação comparativa da viabilidade das células PC12 após ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24 h..	54
FIGURA 13: Análise morfológica comparativa das células PC12 após o ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24 h	56
FIGURA 14: Análise do comprimento médio e do número de pontos de ramificações de neuritos das células PC12 após o ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24 h..	58
FIGURA 15: Análise morfológica de células da cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas após 24 h de tratamento com a rutina a 0,5 µM.	59

ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
6-OHDA	6 Hidroxidopamina
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
A β	Alfa beta
BHE	Barreira hematoencefálica
C4H	Monooxigenase Cinamato 4-hidroxilase
CHS	Chalcona Sintase
CHI	Chalcona Isomerase
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Gás carbônico
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DMEM/HAM F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EAAT	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator neurotrófica derivado da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
GLUT	Glutamato

GPx	Glutathione peroxidase
GS	Proteína Glutamina Sintetase
GSH	Glutathione
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
iGluRs	Receptor ionotrópico de Glutamato
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucinas
IP	Iodeto de Propídio
KA	Cainato
KARs	Receptor cainato
K ⁺	Íon potássio
LabNq	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
L-DOPA	Levodopa
MCC	Meio condicionado de culturas organotípicas cerebrais
mGluRs	Receptor metabotrópico de Glutamato
Mg ²⁺	Íon magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mM	Milimolar
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
Na ⁺	Íon sódio
NG ₂	Proteoglicano de sulfato de condroitina
NGF	Fator de crescimento nervoso
NSF	Fator sensível N-etilmaleimida
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
°C	Grau Celsius
OH	Hidroxila
OPCs	Células Precursoras de Oligodendrócitos
PBS	Tampão Salino Fosfato
RPM	Rotações por minuto
RUT	Rutina

SFB	Soro Fetal Bovino
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPc	Substância Nigra Pars Compacta
SOD	Superóxido dismutase
STN	Núcleo subtalâmico
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
V/V	Volume/volume
VGLUT	Transportadores de Glutamato Vesicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 INTRODUÇÃO AO SISTEMA NERVOSO (SN)	17
2.1.1 Componentes celulares de destaque no Sistema Nervoso Central (SNC)	17
2.2 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA	20
2.2.1 Comportamento neuronal no cenário excitotóxico	22
2.2.2 Astrócitos como componentes chaves da detoxificação e reciclagem do excedente do glutamato	24
2.3 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA COMO MECANISMO DE MORTE CELULAR NEURONAL EM DOENÇAS NEUROGENERATIVAS	25
2.3.1 A excitotoxicidade glutamatérgica na Doença de Parkinson	26
2.4 USO DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 COMO MODELO <i>IN VITRO</i> DE ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON	28
2.5 FLAVONOIDES	29
2.5.1 Potencial terapêutico da rutina	30
3. HIPÓTESE	33
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 MODELOS DE ESTUDO	34
5.1.1 Cultura de células PC12	34
5.1.2 Cultura primária de neurônios/células glias mesencefálicas	35
5.2 EXPOSIÇÃO ÀS DROGAS	36
5.2.1 Tratamento direto das células PC12 e da cultura primária de neurônios/células glias mesencefálicas com o flavonoide rutina	36
5.2.2 Ensaio de lesão direta das células PC12 com o glutamato	36
5.2.3 Tratamento indireto das células PC12 com Meio Condicionado de Culturas Organotípicas Cerebrais (MCC)	36
5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	37
5.3.1 Curva concentração-resposta para o flavonoide rutina em células PC12	37

5.3.2	Curva concentração-resposta para o glutamato em células PC12	38
5.3.3	Ensaio de neuroproteção	39
5.3.4	Análise da morfologia celular	39
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
6.	RESULTADOS	41
6.1	SCREENING DE CITOTOXICIDADE DA RUTINA EM CULTURAS DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12	41
6.2	SCREENING DE CITOTOXICIDADE DO GLUTAMATO EM CULTURAS DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12	43
6.2.1	Glutamato induz mudança morfológica atípica em cultura de células PC12.	45
6.3	RUTINA NÃO APRESENTOU EFEITO NEUROPROTETOR DIRETO EM CULTURA DE CÉLULAS PC12 APÓS DANO INDUZIDO COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMATO.	46
6.3.1	Rutina não foi capaz de inibir a mudança morfológica atípica das células PC12 nos grupos com alta concentração de glutamato	48
6.3.2	Rutina não foi capaz de alterar o comprimento médio de neuritos nas células PC12 nos grupos com alta concentração de glutamato	50
6.4	MEIO CONDICIONADO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE CÉREBRO COM GLUTAMATO E/OU RUTINA INDUZIU BAIXA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS PC12.....	51
6.4.1	Meio condicionado de cultura organotípica de cérebro tratada com glutamato e/ou rutina induziu menores alterações morfológicas em cultura de células PC12	54
6.4.2	Meio condicionado de cultura organotípica de cérebro com glutamato e/ou rutina induziu aumento de pontos de ramificações e aumento do comprimento médio de neuritos nas células PC12	57
6.5	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA PELA RUTINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS/CÉLULAS GLIAIS MESENCEFÁLICAS	54
7.	DISCUSSÃO	60
8.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

O avanço da idade populacional está diretamente associado a uma alta prevalência de diversas doenças neurodegenerativas. Uma vez que o processo de envelhecimento é marcado por uma perda fisiológica neuronal que ocorre em diversas regiões do encéfalo, eventos de lesão e morte celular tornam-se inevitáveis e podem aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento de neuropatologias como a Doença de Parkinson (DP), Doença de Alzheimer (DA), Doença de Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (BAK e CHANDRAN, 2012; ABELIOVICH e GITLER, 2016; CANTER *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2016; WYSS-CORAY, 2016).

Atualmente as doenças neurodegenerativas ocupam um posto de grande relevância social e são consideradas um dos grupos de doenças mais caras da senescência. Por tratar-se de enfermidades crônicas com evolução debilitante e tratamento puramente sintomático, há uma grande urgência para a identificação de medidas preventivas e/ou terapêuticas na tentativa de evitar que estas doenças se tornem um fardo financeiro e social no futuro (DORSEY *et al.*, 2007; PROCACCINI *et al.*, 2016). Para isso, é necessária uma melhor compressão dos mecanismos de morte celular neuronal envolvidos na progressão das patologias neurodegenerativas.

As disfunções inerentes à ação de aminoácidos excitatórios suscitam uma série de eventos importantes envolvidos com a progressão dessas patologias. A excitotoxicidade glutamatérgica, mais especificamente, é capaz de desencadear a morte neuronal no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos através de diversas vias. A principal delas envolve a perda de homeostasia do íon cálcio após ativação exacerbada dos receptores de glutamato, que em níveis intracelulares elevados passa a causar neurotoxicidade, resultando na degradação de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (AMANI *et al.*, 2016). Adicionalmente, a hiperatividade dos receptores do glutamato aumenta significativamente a geração de radicais livres, o que também contribui para a morte programada dos neurônios (PRENTICE *et al.*, 2015).

A prospecção de metabólitos secundários vegetais, por sua vez, tem possibilitado identificar e orientar o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com grande potencial antioxidante e neuroprotetor capaz de prevenir ou tratar doenças do SNC. Os flavonoides, um grupo de compostos polifenólicos de destaque no reino vegetal, apresenta uma gama de efeitos biológicos extensivamente relatados na literatura (GROSSO *et al.*, 2013; DE ANDRADE-TELES *et al.*, 2018). A rutina, por exemplo, é um glicoflavonol com propriedades

farmacológicas já observados em diversos modelos de doença *in vitro* e *in vivo* do SNC. Evidências substanciais indicam que sua ação neuroprotetora ocorra através principalmente da inibição da neurotoxicidade através da indução do aumento da expressão de enzimas antioxidantes, através da regulação positiva de genes protetores capazes de evitar a morte de células neuronais incluindo tirosina hidroxilase (Th), o fator sensível N-etilmaleimida (NSF) e o homólogo atrofico óptico 1 (genes OPA1), e através da sua forte capacidade inibitória da neuroinflamação (MAGALINGAM *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2016). Vale acrescentar que em trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que a rutina atua protegendo cultura organotípica de cérebro de ratos contra a morte induzida pelo glutamato através da modulação do metabolismo glial e modulação positiva da expressão de transportadores de aminoácidos excitatórios (FERREIRA, 2016).

O desenvolvimento de estudos a partir de modelos de cultura de células é uma das principais alternativas para compreender os mecanismos subjacentes ao processo de excitotoxicidade glutamatérgica e neuroproteção induzida por compostos polifenólicos (para revisão ver CHOI, 1988). No entanto, embora a utilização de cultura de células PC12 tenha crescido como modelo de estudo potencialmente útil para elucidar os mecanismos de dano neuronal envolvidos em muitos processos neurodegenerativos (RUKENSTEIN *et al.*, 1991; GREENE *et al.*, 2006; MAGALINGAM *et al.*, 2014; KRITIS *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019), pouco se conhece sobre a ação neuroprotetora da rutina para células PC12 em condições de excitotoxicidade glutamatérgica em DP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO AO SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso (SN) é um complexo órgão biológico que engloba um distinto conjunto de células e nervos altamente especializados envolvidos na transmissão de sinais para diferentes partes do corpo humano. O principal componente celular do sistema nervoso, o neurônio, desempenha funções relacionadas à captação, processamento e coordenação de diversas informações, sejam endógenas ou exógenas, com capacidade de induzir respostas fortemente específicas a essas mudanças (MACHADO, 2006).

Estruturalmente, o SN é dividido em sistema nervoso central (SNC), localizado mais precisamente dentro do esqueleto axial, formado pelo encéfalo e medula espinhal; e sistema nervoso periférico (SNP), localizado fora do esqueleto e formado pelos nervos, gânglios e terminações nervosas (MACHADO, 2005; GORDON-BETTS *et al.*, 2013). Funcionalmente, o SN apresenta duas partes principais, o componente somático, responsável pela integração do organismo ao meio ambiente e o componente visceral, responsável pelo controle das estruturas viscerais a fim de manter a homeostase do organismo (NETO e FLAVIGNA, 2003; LENT, 2010). Este último ainda se subdivide em sistema nervoso visceral aferente (condutor das informações sensoriais do ambiente para o SNC) e o sistema nervoso visceral eferente ou autônomo (responsável por manter as funções vitalícias em ordens) (DIAMOND *et al.*, 1985; GORDON-BETTS *et al.*, 2013).

2.1.1 Componentes celulares de destaque no Sistema Nervoso Central (SNC)

O SNC compreende duas principais regiões do cérebro que abrigam uma vasta população de células responsáveis por funções centrais ao corpo humano. O encéfalo, porção central do SNC, é representado pelo telencéfalo (o qual corresponde aos hemisférios cerebrais), pelo diencéfalo (tálamo, metatálamo, epitálamo, hipotálamo e subtálamo), pelo cerebelo e tronco encefálico, este último subdividido em bulbo, mesencéfalo e ponte (DIAMOND *et al.*, 1985; LENT, 2010). A medula espinhal é a parte mais distendida do SNC e apresenta uma composição de células distinta do encéfalo. No entanto, ambas dispõem das chamadas substância cinzenta (formada pelos corpos celulares neuronais e gliais) e substância branca (composta principalmente pelos prolongamentos neuronais) (DIAMOND *et al.*, 1985; LENT, 2010). Juntos, os neurônios e as células gliais formam os dois principais tipos de células do SN (figura 1).

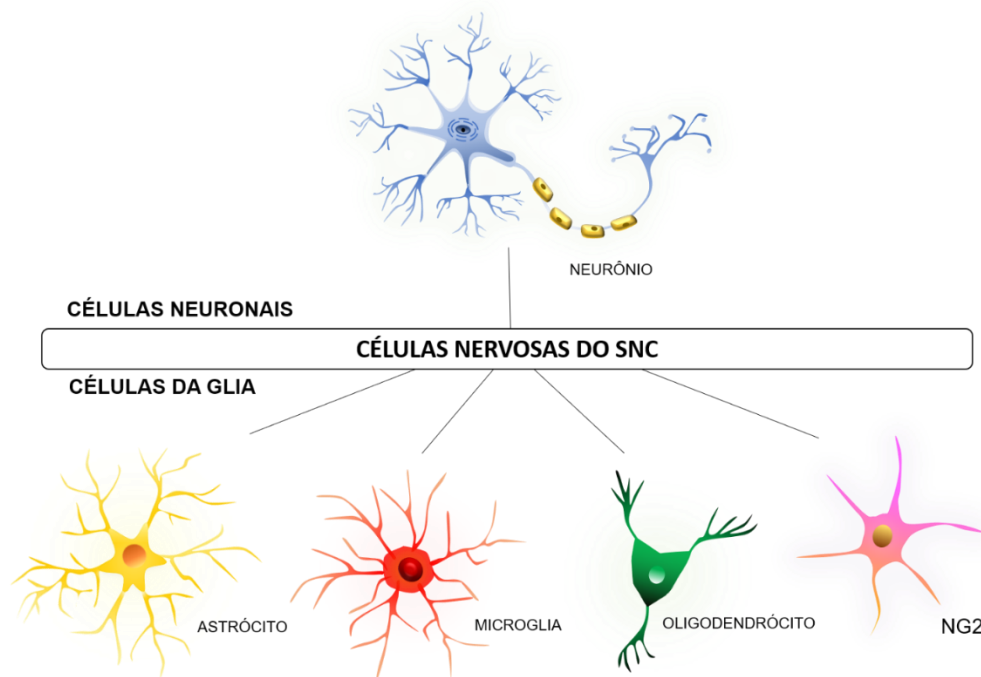


Figura 1: Os principais tipos celulares do SNC compreendem as células neuronais e as células da glia, as quais se subdividem em astrócitos, microglia, oligodendrócitos e NG2 (autoria: Jéssica Teles).

Os neurônios são células providas de axônios e dendritos diretamente envolvidos na transferência e processamento de informações. Segundo Azevedo e colaboradores (2009), cerca de 86 bilhões de neurônios residem em um cérebro humano do sexo masculino adulto, acompanhado de 85 bilhões de células gliais. No entanto, as estimativas exatas da razão neurônio/glia ainda não estão totalmente elucidadas (HERCULANO-HOUZEL, 2014). As células da glia compreendem, por sua vez, as células nervosas especializadas no fornecimento de suporte nutritivo, imunológico e protetor para os neurônios. A sua população total pode ser subdividida em quatro grupos principais: os oligodendrócitos, as células NG2, a microglia e os astrócitos que dispõem-se comumente circundando o corpo celular, axônios e dendritos neuronais estabelecendo interações diretas (FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2002; HERCULANO-HOUZEL e LENT, 2005; JÄKEL e DIMOU, 2017).

Os oligodendrócitos são responsáveis pela produção e manutenção das bainhas de mielina dos axônios, essenciais para a rápida condução dos sinais elétricos no SN. Há diferentes linhagens de oligodendrócitos no SNC que são originadas de diferentes células progenitoras, sendo a medula espinhal capaz de gerar cerca de 85-90% dessas células (CAI *et al.*, 2005;

SIMONS e NAVE, 2015). As células NG2, por sua vez, são assim denominadas devido a expressão do proteoglicano de sulfato de condroitina NG2. Essas células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) estão envolvidas com a promoção da motilidade de células endoteliais (FUKUSHI *et al.* 2004; revisado por NISHIYAMA *et al.*, 2014), e na produção de astrócitos protoplasmáticos na massa cinzenta (ZHU *et al.*, 2008a, b). Curiosamente, estudos relataram que as células que expressam o proteoglicano NG2 são capazes de estabelecer sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas com neurônios. Consequentemente, células NG2 podem ser sugeridas como células potenciadoras da liberação de glutamato e GABA (BERGLES *et al.*, 2000; LIN e BERGLES, 2004a, b; KULA, CHEN e KUKLEY, 2019).

A microglia compreende uma importante população celular envolvida na vigilância imunológica do SNC. Estas células desempenham funções fagocitárias já bem definidas, com participação adicional na regulação da inflamação inata e adaptativa. São ainda capazes de responder a sinais imunes de estresse ou dano celular decorrente da ação de patógenos, induzindo respostas protetoras específicas por meio da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (WOLF *et al.*, 2017).

Outro grupo celular da glia de destaque no SNC são os astrócitos. As células astrocitárias são responsáveis por executar funções substanciais para manutenção da homeostase do cérebro e sustentação da atividade neuronal (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). (HERCULANO-HOUZEL, 2014; KHAKH e DENEEN, 2019). São células capazes de fornecer nutrientes e oxigênio captado diretamente do sangue para os neurônios, além do suporte metabólico e de exercer importante papel na remoção dos produtos gerados do metabolismo. Ademais, os astrócitos auxiliam na migração neuronal, no controle do equilíbrio iônico, no processo de eliminação de espécies reativas de oxigênio e desempenham atividades relacionadas à defesa imune inata no SNC (HERCULANO-HOUZEL e LENT, 2005; DRINGEN *et al.*, 2015). Em resumo, estudos têm demonstrado que na ausência das células astrocitárias, a sobrevida neuronal é significativamente baixa (ALLEN, 2014; JÄKEL e DIMOU, 2017).

A reatividade dos astrócitos é descrita como um dos mecanismos endógenos necessários para restringir as lesões iniciais no SN e impedir o avanço de prováveis danos. Este evento de reatividade astrocitária ou astrogliose reativa é caracterizada por uma série de alterações celulares, moleculares, funcionais e fenotípicas significativas, além da hipertrofia e proliferação celular. Essas alterações incluem o aumento na expressão de filamentos intermediários (principalmente as proteínas ácidas fibrilares gliais -GFAP) e liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, as quais incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α),

fator de crescimento transformante beta (TGF- β), interferon gama (IFN- γ) e interleucinas (IL-1 e IL -6) (JOGHATAEI e MEHRABI, 2019).

Em adição, a capacidade em participar do tráfego e da reciclagem de neurotransmissores coloca os astrócitos em um lugar de destaque na prevenção contra excitotoxicidade glutamatérgica (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; DRINGEN *et al.*, 2015; KHAKH e SOFRONIEW, 2015; KHAKH e DENEEN, 2019), uma vez que em condições de hiperatividade induzida pelo glutamato, observada em diversas doenças neurodegenerativas, os astrócitos captam e metabolizam o excesso do neurotransmissor liberado pelos neurônios (MARTINEZ-HERNANDEZ *et al.*, 1977; revisado por SCIMEMI *et al.*, 2019).

2.2 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, participa de uma série de atividades importantes para o funcionamento cerebral. Sua ação excitatória é necessária para a transdução de sinais, regulação da plasticidade sináptica, crescimento neuronal e orientação do axônio, além de participar do processo de aprendizagem e formação de memória, entre outras funções já bem documentadas (LAI *et al.*, 2014). Como principal mediador dos sinais excitatórios, o glutamato deve ser mantido em concentrações adequadas, em locais apropriados e liberados somente em momentos específicos, sendo de importância fundamental que as células neuronais resistam a este nível fisiológico de estimulação. Caso não ocorra a remoção do glutamato da fenda sináptica, inicia-se um processo denominado de “excitotoxicidade” (ZHOU e DANBOLT, 2014).

Entende-se por excitotoxicidade o processo patológico que resulta na morte celular promovida pela estimulação prolongada e excessiva de aminoácidos excitatórios. Essa condição de hiperexcitação, comumente provocada pelo excesso de glutamato na fenda sináptica, promove uma série de processos intracelulares que culminam na apoptose celular via sobrecarga de cálcio, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação de enzimas catabólicas (BERLIOCCI *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2009; KRITIS *et al.*, 2015; AMANI *et al.*, 2016) (Figura 2).

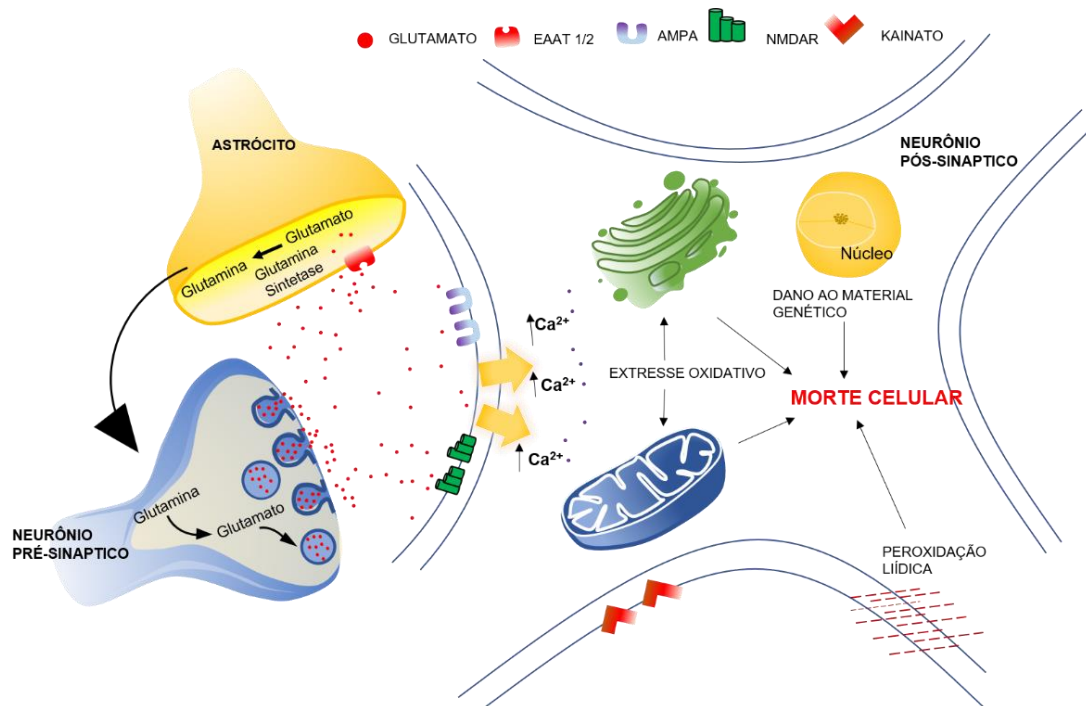


Figura 2: Representação esquemática do processo excitotóxico resultante do excesso de glutamato. A liberação desregulada do glutamato (armazenado em vesículas neuronais) na fenda sináptica promove a ativação de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos (NMDAR, AMPAR e KAR). Uma vez ativados, ocorre o influxo excessivo de cálcio para o citoplasma neuronal, o qual pode resultar em dano de organelas citoplasmáticas, estresse oxidativo, disfunção da mitocôndria e do complexo de golgi, além da peroxidação lipídica e lesão direta de ácidos nucléicos que, juntos, culminam na apoptose celular. O astrócito, por sua vez, atua detoxificando o excedente de glutamato, que é transportado via receptores EAAT 1/2, e convertido em glutamina através da ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina então pode ser reaproveitada pelos neurônios para produção de novos neurotransmissores. (Autoria: Jéssica Teles).

Os mecanismos subjacentes ao dano celular provocado pelo excesso de glutamato são complexos. O primeiro deles envolve o influxo sustentado de Ca^{2+} , que desencadeia uma série de eventos neurotóxicos associados a entrada do íon pelos receptores ionotrópicos (SATTLER *et al.*, 1998; CROSS *et al.*, 2010). Esta via de morte celular atua exatamente em organelas sensíveis ao Ca^{2+} , resultando em disfunção principalmente do retículo endoplasmático e da mitocôndria com consequente apoptose celular. Dependendo da magnitude do influxo, o Ca^{2+} leva à morte celular por necrose, se for intenso e rápido ou à apoptose se a estimulação for menos intensa e crônica (BERLIOCCHI *et al.*, 2005; NIQUET *et al.*, 2006; NICHOLLS, 2008).

Uma segunda via que medeia a morte neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica envolve o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são naturalmente geradas como produto do metabolismo do oxigênio e controlados pelo sistema de proteção antioxidante celular em condições fisiológicas. No contexto das doenças neurodegenerativas, essa homeostase redox em neurônios é afetada, pois EROs passam a ser produzidas em excesso e, quando associada à ineficiência da maquinaria anti-oxidante da célula, pode provocar a morte neuronal por lesão direta de ácidos nucleicos e proteínas, promoção da peroxidação lipídica, alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; AMANI *et al.*, 2016).

Um terceiro mecanismo é dependente da disfunção mitocondrial e da perturbação dos complexos respiratórios. As mitocôndrias neuronais, quando íntegras e viáveis, atuam não apenas como usinas de energia celular, mas também como organelas capazes de determinar o destino das células para sobrevivência ou morte (NUNNARI e SUOMALAINEN, 2012). Sob condições patológicas, a permeabilidade da membrana mitocondrial e suas funções fisiológicas críticas são suscetíveis a alterações dramáticas. As mitocôndrias apresentam capacidade natural para armazenagem de cálcio e diante do influxo sustentado do íon em condições de hiperatividade glutamatérgica, o processo de morte celular é potencializado pela liberação de mais cálcio para o citosol celular. Isso resulta em peroxidação lipídica e liberação de fatores pró-apoptóticos, os quais regulam a morte celular dependente das caspases ou induzindo a autofagia (YUAN e YANKNER, 2004; GOGVADZE e ORRENIUS, 2006; DONG *et al.*, 2009; KROLS *et al.*, 2016; AUFSCHNAITER *et al.*, 2017).

2.2.1 Comportamento neuronal no cenário excitotóxico

Existe uma grande diversidade de neurônios no cérebro, os quais variam em tamanho, forma e função (SHARPEE, 2014). Funcionalmente, conforme o tipo de conexão estabelecida pelas células, os neurônios podem ser classificados em neurônio sensitivo, motor ou interneurônio (CLARK *et al.*, 2006; SHARPEE, 2014). Estes ainda podem ser classificados em neurônios dopaminérgicos, colinérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos, a depender da primeira substância que foi descoberta e liberada pela célula e que exerce ação diretamente sobre a membrana pós-sináptica, quase sempre produzindo nela um potencial de ação (HYMAN *et al.*, 1991; LENT, 2010). Os neurônios são as células do cérebro encarregadas pelo processamento das informações associadas a sensações, pensamentos, sentimentos e ações. Esse processamento acontece após o estabelecimento de sinapses neuronais, o que permite a

troca dos sinais eletroquímicos a partir de conexões entre dendritos e axônios de diferentes neurônios. Em adição, os astrócitos também podem fazer parte das sinapses neuronais em alguns processos (VENTURA e HARRIS, 1999; ARAQUE *et al.*, 1999; LENT *et al.*, 2010).

O processo de transdução de sinal no SNC envolvendo o glutamato como sinalizador inicia-se após a sua liberação na fenda sináptica, processo mediado pelos transportadores de glutamato vesicular (VGLUTs) (MAYCOX, HELL e JAHN, 1990; FREMEAU *et al.*, 2004a; LIGUZ-LECZGAR e SKANGIEL-KRAMSKA, 2007). Existem três variantes de VGLUT, denominadas VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3, sendo as isoformas 1 e 2 expressas em todos os neurônios glutamatérgicos e sugeridas como principais membros da transmissão sináptica (HERZOG *et al.*, 2001; FREMEAU *et al.*, 2004; LIGUZ-LECZGAR e SKANGIEL-KRAMSKA, 2007). Havendo falhas da atividade da VGLUT, a liberação vesicular é diretamente comprometida e conseqüentemente, a neurotransmissão glutamatérgica também é afetada (SMEAR *et al.*, 2007; SEAL *et al.*, 2008; HE, 2012).

Uma vez presente na fenda sináptica, o glutamato difunde-se até ligar-se aos seus receptores neuronais específicos. Neste momento ocorre a despolarização celular e um sinal pós-sináptico excitatório acontece. Até o momento, duas grandes classes de receptores são conhecidas: os ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) (PINHEIRO e MULLE, 2008; REINER e LEVITZ, 2018).

Os iGluRs, proteínas integrais de membrana, são assim chamados por formarem um poro de canal iônico característico capaz de responder de forma rápida a ativação do glutamato, através da alteração do estado eletroquímico da membrana pós-sináptica, bem como do fluxo de íons (PINHEIRO e MULLE, 2008; REINER e LEVITZ, 2018). Os iGluRs são subdivididos em três famílias N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA), os quais estão associados à estimulação da neurotransmissão excitatória rápida. Os NMDARs são os canais mais permeáveis ao íon Ca^{2+} e após ativação do glutamato, o íon magnésio que atua bloqueando o canal iônico é liberado e o receptor é ativado permitindo os eventos intracelulares relacionados a excitotoxicidade. Os AMPARs e KARs são canais mais permeáveis aos íons Na^+ e K^+ e menos ao Ca^{2+} , no entanto, fisiologicamente, estes receptores regulam a rápida excitação envolvida na remoção do Mg^{2+} e ativação dos NMDARs, contribuindo também para o processo de excitotoxicidade (DINGLELINE *et al.*, 1999; SWANSON e SAKAI, 2009; REINER e LEVITZ, 2018).

Os mGluRs por sua vez, atuam intracelularmente de forma acoplada e dependente da proteína G. São receptores classificados de acordo com suas vias de transdução de sinal (grupo I, II e III) os quais compreendem os receptores que vão de mGluR1 ao mGluR8 (CRUPI,

IMPELLIZZERI e CUZZOCREA, 2019). Diferentemente dos iGluRs, os mGluRs desencadeiam uma resposta neurotransmissora mais lenta por, muitas vezes, requererem uma mudança conformacional do receptor ou modificações diretamente da expressão gênica (PINHEIRO e MULLE, 2008).

Fisiologicamente, a ação do glutamato na fenda sináptica deve ser finalizada por meio da captação celular neuronal ou astrocitária, visto que não existem enzimas extracelulares com a capacidade de degradar o glutamato (DANBOLT, 2001; VANDENBERG e RYAN, 2013). O controle das concentrações fisiológicas do glutamato no meio extracelular é crítico para o funcionamento do SNC e é estabelecido principalmente pela ação dos astrócitos, os quais apresentam transportadores específicos para recaptação do glutamato e são capazes de reciclá-lo por meio do ciclo glutamato-glutamina (BAK *et al.*, 2006).

2.2.2 Astrócitos como componentes chaves na detoxificação e reciclagem do excedente do glutamato

Além de todas as funções das células astrocíticas relacionadas ao suporte e manutenção da homeostase do cérebro anteriormente citadas neste estudo, essas células ainda exercem uma atividade adicional sob condições de excitotoxicidade: capacidade de detoxificação e regulação da homeostase dos neurotransmissores cerebrais, especialmente o glutamato. Para tanto, transportadores de glutamato presentes nos prolongamentos astrocitários são sinalizados quando há a presença do neurotransmissor nas fendas sinápticas afim de evitar uma eventual hiperexcitação neuronal (ANDERSON e SWANSON, 2000; revisado por SCIMEMI *et al.*, 2019).

Os transportadores de maior relevância no processo excitotóxico são chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). A captação do glutamato extracelular pelos EAATs ocorre através do transporte ativo e envolve a regulação do gradiente eletroquímico, mais precisamente de sódio e potássio. Até o momento cinco isoformas do transportador já foram descritas: EAAT-1 a EAAT-5 (ANDERSON e SWANSON, 2000; ROSE, ZIEMENS e UNTIET, 2018). Destas cinco, as duas isoformas de humanos EAAT-1 e EAAT-2, são descritas em murinos como transportador de glutamato-aspartato (GLAST) (STORCK *et al.*, 1992) e transportador de glutamato-1 (GLT-1), respectivamente (MATHISEN, SEEBERG e KANNER, 1992). Ambas são expressas nos astrócitos e realizam a captação de aproximadamente 80-90% do glutamato extracelular no SNC, sendo importantes alvos de investigação em diversas doenças neurodegenerativas (LEHRE e DANBOLT, 1998;

EULENBURG e GOMEZA, 2010). As outras isoformas são expressas em neurônios pós-sinápticos, sendo o EAAT3 presente em baixas concentrações em toda superfície cerebral, o EAAT4 e o EAAT5 sendo transportadores expressos predominantemente no cerebelo e retina, respectivamente (DANBOLT *et al.*, 1998; DIVITO e UNDERHILL, 2014).

Uma vez que ocorre a captação do excedente de glutamato pelos astrócitos, inicia-se a metabolização e reciclagem do neurotransmissor. Este processo ocorre através da conversão enzimática do glutamato a um produto não tóxico, a glutamina, por intermédio da enzima glutamina sintetase (WANIEWSKI e MARTIN, 1986; revisado por SCIMEMI *et al.*, 2019). A glutamina, por sua vez, é liberada no espaço extracelular podendo ser transportada para os neurônios e utilizada como precursor de novos neurotransmissores, como o glutamato ou GABA (BRÖER e BROOKES, 2001). Estes neurotransmissores, por sua vez, podem ser reciclados e armazenados em vesículas para serem novamente liberados quando for deflagrado um novo potencial de ação (HERTZ, DRINGEN, SCHOUSBOE, 1999; BAK *et al.*, 2006).

2.3 EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA COMO MECANISMO DE MORTE CELULAR NEURONAL EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O estabelecimento de circuitos neuronais no SNC é o que permite as funções básicas para o corpo humano. As falhas de comunicação celular podem interromper o funcionamento cerebral e resultar no surgimento de problemas generalizados associados às doenças degenerativas (BAK e CHANDRAN, 2012; ABELIOVICH e GITLER, 2016; CANTER *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2016; WYSS-CORAY, 2016). Por definição, os distúrbios neurodegenerativos são doenças resultantes da morte progressiva de neurônios em áreas específicas do cérebro, originando sinais e sintomas neurológicos e neuropsicológicos característicos (BERMAN e BAYATI, 2018).

Embora haja uma grande comoção e trabalho árduo para identificar os mecanismos exatos envolvidos com a etiologia e progressão das doenças neurodegenerativas, ainda não foi descoberto a cura para nenhuma delas (HEEMELS, 2016). A Esclerose lateral amiotrófica (ELA), a Doença de Huntington (DH), a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP) integram, atualmente, um grupo de distúrbios neurodegenerativos com maior impacto social e econômico. A identificação de agentes terapêuticos mais eficazes, por sua vez, é dependente de uma compreensão mais aprofundada das possíveis causas e mecanismos de morte celular envolvidos nesses distúrbios. (BERMAN e BAYATI, 2018).

No contexto da ELA, distúrbio neurodegenerativo que afeta os neurônios motores superiores no córtex motor e neurônios motores inferiores no tronco cerebral e na medula espinhal, a morte excitotóxica das células neuronais tem sido proposto como um mecanismo patogênico chave envolvido na doença (COYLE e PUTTFARCKEN, 1991; BROWN e ROBBERECHT, 2001; HEATH e SHAW, 2002; FORAN e TROTTI, 2009). Estudos sugerem que há um aumento da neurotransmissão glutamatérgica durante o curso da ELA (PLAITAKIS e CAROSCIO, 1987), sendo que a neurotoxicidade é potencializada após ativação dos receptores AMPA, permeáveis ao cálcio (CARRIEDO *et al.*, 1996). Ademais, outros estudos sugerem que exista um defeito na função do EAAT2/GLT-1 nos astrócitos (ROTHSTEIN *et al.*, 1995; revisado por ROSENBLUM e TROTTI, 2017).

A DH, por sua vez, é caracterizada por morte neuronal na região do estriado e córtex (VONSATTEL e DiFIGLIA, 1998), acompanhado de disfunção do hipocampo (SPARGO, EVERALL e LANTOS, 1993). Trata-se de uma disfunção motora e cognitiva decorrente de uma alteração genética nas repetições de CAG no gene que codifica a proteína huntingtina, reconhecida por participar da apoptose celular, transporte de vesículas, sinalização celular e regulação transcricional, além de atuar na neurogênese, transporte axonal e produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (HARJES e WANKER, 2003). Uma vez mutada, esta proteína apresenta capacidade em alterar a neurotransmissão glutamatérgica e interferir numa maior ativação dos receptores NMDA, o que permite o influxo excessivo do Ca^{2+} seguida de lesão e morte neuronal, ao passo que diminui a expressão dos EAATs, comprometendo a captação e detoxificação do neurotransmissor excedente (YOUNG *et al.*, 1988; ALBIN *et al.*, 1990; ESTRADA SANCHEZ *et al.*, 2008; CLABOUGH, 2013).

A excitotoxicidade glutamatérgica também é descrita como mecanismo de morte celular para a DA, doença caracterizada pela presença de agregados extracelular do peptídeo β amilóide ($A\beta$) e pela formação emaranhados neurofibrilar em neurônios originalmente do hipocampo (INGELSSON *et al.*, 2004). A presença do peptídeo $A\beta$ mostrou-se capaz de exercer uma regulação negativa na captação do glutamato (HARRIS *et al.*, 1995) resultando em déficit na reciclagem do neurotransmissor via transportadores astrocitários (SCOTT, GEBHARDT *et al.* 2011). Além disso, a progressão da DA está associada ao aumento da ativação do receptor NMDA (GRIFFITH *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009; WANG R, REDDY, 2017).

2.3.1 A excitotoxicidade glutamatérgica na Doença de Parkinson

A DP é um distúrbio progressivo crônico neurodegenerativo (HORNYKIEWICZ, 1966) caracterizada como um grave e debilitante problema de saúde pública que provoca uma série de sintomas motores (tremor em repouso, bradicinesia, ataxia e rigidez) e alterações funcionais não-motoras (ansiedade, redução cognitiva, depressão, demência e distúrbios autonômicos) (DAWSON; DAWSON, 2003; GIRÁLDEZ-PÉREZ *et al.*, 2014; KALIA e LANG, 2015). Embora a etiologia da DP não esteja claramente elucidada, estudos apontam que a causa da doença é multifatorial e que fatores genéticos e ambientais se inter-relacionam culminando diretamente na morte dos neurônios. Do ponto de vista epidemiológico, a DP é considerada a segunda desordem neurológica mais prevalente do sistema nervoso central, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer (DORSEY *et al.*, 2007; PROCACCINI *et al.*, 2016).

Patologicamente, a DP envolve dois eventos críticos básicos: a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (figura 3); e o depósito acentuado da α -sinucleína, proteína responsável pelos agregados anormais chamados de corpos de Lewy (DICKSON *et al.*, 2009; HALLIDAY *et al.*, 2011). Conforme os neurônios são degenerados durante o curso da doença, regiões pontuais do cérebro são particularmente afetadas em diferentes estágios da DP. Durante o início da patogênese, a morte neuronal é predominante na substância nigra ventrolateral, e no estágio final, a neurodegeneração passa a ser mais difundida (FEARNLEY e LEES, 1991; DAMIER *et al.*, 1999). Os mecanismos potenciais de morte dos neurônios dopaminérgicos envolvem, entre alguns fatores, a excitotoxicidade do glutamato (AMANI *et al.*, 2016; VELASCO *et al.*, 2017).

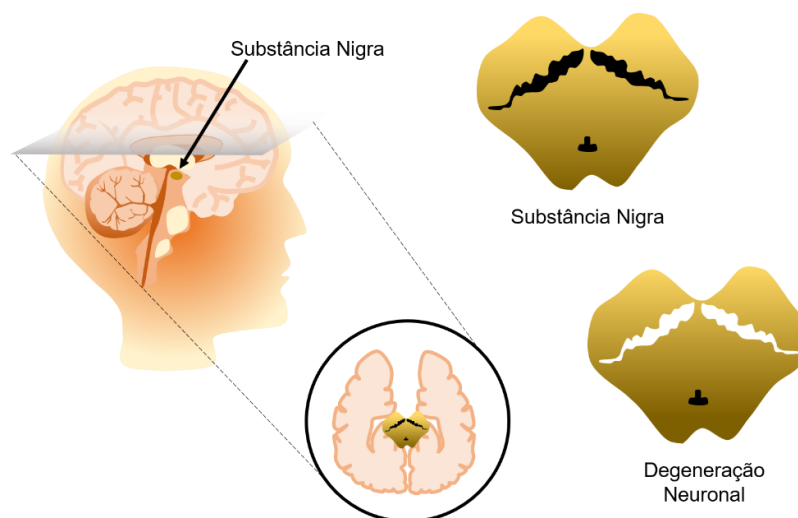


Figura 3: Região mesencefálica evidenciando perda celular progressiva na Substancia Nigra Pars Compacta (SNPc) associada a Doença de Parkinson (Autoria Jéssica Teles)

Fisiologicamente, as projeções glutamatérgicas são enviadas do córtex para quatro regiões específicas: estriado, núcleo subtalâmico (STN), tálamo, e SNPc (ALBIN *et al.*, 1990), sendo que SNPc recebe inervações glutamatérgicas do STN, e este, por sua vez, é regulado pelos gânglios da base. Em situações de depleção de dopamina, observado na DP, a liberação de glutamato é potencializada (WICHMANN e DELONG, 1993). Isso acontece pois o aumento da atividade do STN é resultante da diminuição da mensagem dopaminérgica que chega no estriado e isso repercute na liberação de glutamato para a SNPc. Então, o glutamato excita os neurônios dopaminérgicos que expressam os receptores glutamatérgicos e os levam a neurodegeneração via influxo de Ca^{2+} geração das EROs e disfunção mitocondrial (RODRIGUEZ *et al.*, 1998; VELASCO *et al.*, 2017).

2.4 USO DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 COMO MODELO *IN VITRO* DE ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Diversos modelos biológicos são descritos na literatura como ferramentas de indução de danos em neurônios dopaminérgicos relacionados a toxinas químicas como MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), 6-OHDA (6- hidróxidopamina), aminocromo, entre outras. O uso de animais e linhagens neurais para delinear os diferentes aspectos associados a DP possibilita compreender como os fatores químicos, genéticos e ambientais participam da progressão da doença, bem como investigar potenciais alvos terapêuticos (JAGMA *et al.*, 2015).

As linhagens celulares compreendem uma alternativa potencialmente útil para estudar as causas e possíveis tratamentos de uma grande variedade de doenças neurodegenerativas, bem com a DP. As células PC12 são definidas como uma linhagem celular clonal derivada de feocromocitoma (tumor originário das glândulas adrenais) de rato e, quando cultivadas em meio apropriado, proliferam e liberam catecolaminas como a dopamina (GREENE e TISCHLER, 1976). Trata-se de uma cultura celular que apresenta capacidade em responder ao fator de crescimento nervoso (NGF), passando, portanto, por processo de diferenciação neuronal e apresentando comportamento característico dessas células (MALAGELADA e GREENE, 2008).

A linhagem de células PC12 tem sido utilizada largamente como modelo de estudos para fins de triagens de agentes causadores de DP, bem como de alvos terapêuticos. Atualmente é um dos principais objetos de estudos como linhagem celular para estabelecimento de modelos

in vitro envolvendo morte neuronal, mais de 17.000 estudos até o momento, (MAGALINGAM *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019). Vale reiterar que um recente artigo do grupo de pesquisa Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) da Universidade Federal da Bahia relatou a proteção de células PC12 contra a toxicidade induzida por glutamato após tratamento com extratos obtidos de sementes da *Amburana Cearensis* (PEREIRA *et al.*, 2017).

Diante das escassas intervenções terapêuticas realmente eficazes para o tratamento das doenças neurodegenerativas em geral, a prospecção de metabólitos secundários vegetais tem surgido como uma possibilidade de identificar e orientar o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos capazes de regular os eventos envolvidos no processo de sinalização para morte celular neuronal (BUSCH *et al.*, 2015).

2.5 FLAVONOIDES

Os flavonoides constituem uma classe de metabólitos secundários de baixo peso molecular presentes em um grande número de plantas, frutas, legumes e bebidas, como vinhos e chás (ZIBADI *et al.*, 2014; PANCHE *et al.*, 2016). São os compostos polifenólicos mais comuns descritos na literatura, com grande destaque no âmbito científico devido a sua gama múltipla de atividades farmacológicas com interesse à saúde humana (ROMANO *et al.*, 2013; PANCHE *et al.*, 2016). Fitoquímicos como estes, dispõe de diversos alvos celulares, sendo portanto sugeridos como potentes agentes terapêutico para o tratamento de diversas doenças, como a DP, DA, DH, ELA diabetes tipo II, câncer, doenças oftálmicas, e doenças cardiovasculares (NAM *et al.*, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2018; BUNGAU *et al.*, 2019; MAHMOUD *et al.*, 2019).

Encontram-se distribuídos no reino vegetal milhares de flavonoides identificados até o presente com diversas atividades biológicas já descritas na literatura (XIAO, 2017). Estes foram divididos em 6 subclasses de acordo com suas variações estruturais: 1) flavonóis (rutina, quercetina), 2) flavanóis (catequina, epicatequina e epigalocatequina), 3) isoflavonas (genisteína, daidzeína, glycetin, e formanantine), antocianidinas (cianidina, malvidine, e Delfinidina), flavanonas (hesperitina, naringenina) e flavonas (apigenina, luteolina) (MANACH *et al.*, 2004; FERREYRA *et al.*, 2012). A estrutura básica dos flavonoides consiste em um esqueleto de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) e 2 anéis fenólicos ligados a um ou mais grupos hidroxila (OH) (MAHMOUD *et al.*, 2019) e diferem um do outro quanto a presença ou ausência de ligações duplas, grau de hidrogenação, metilação, malonilações, sulfatações, entre

outros, que estão diretamente relacionadas às atividades bioquímicas de cada um (CHAE *et al.*, 2019). Ademais, os compostos fenólicos ocorrem em plantas geralmente ligados a ésteres, éteres e glicídios ou até mesmo uma mistura deles (MIDDLETON *et al.*, 2002).

Os polifenóis são reconhecidos como uma importante ferramenta de defesa antioxidante natural das plantas, exibindo ainda um potencial medicinal para além disto. Entre os efeitos farmacológicos reportados até o momento, os flavonoides apresentam: capacidade anti-inflamatória associada a supressão da ativação microglial (SPENCER *et al.*, 2012), potencial anticancerígeno (ABOTALEB *et al.*, 2018), antioxidante (RAJABIAN *et al.*, 2018), antialérgico (ESCRIBANO-FERRER *et al.*, 2019), antimicrobiano (FARHADI *et al.*, 2019), antiviral (ZAKARYAN *et al.*, 2017), antidepressivo (KHAN *et al.*, 2018) e neuroprotetor (WILLIAMS e SPENCER, 2012, SPENCER *et al.*, 2012; AYAZ *et al.*, 2019).

Em condições neuropatológicas, os compostos polifenólicos têm sido descritos como potenciais estratégias terapêuticas capazes de intervir na morte neuronal. Sugere-se que os mecanismos de ação dos flavonoides em condições neurodegenerativas incluem: a modulação de vias de sinalização celular para proteção antioxidante dos neurônios e regulação negativa de fatores pró-inflamatórios e modulação da resposta astrocitária (SPENCER, 2007; SOLANKI *et al.*, 2016). Para tanto, os flavonoides devem ser capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), habilidade esta já comprovada em estudos com diferentes compostos (YOUUDIM *et al.*, 2004; SOLANKI *et al.*, 2016).

2.5.1 Potencial terapêutico da rutina

A rutina (quercetin-3-O-rutinoside) (Figura 4) é um glico-flavonol presente em uma grande variedade de produtos alimentícios, como a maçã, cebola, tomate, feijão vermelho, trigo, uva, vinho tinto e chá preto (HOLLMAN *et al.*, 1996; THOMSON *et al.*, 1999). Quimicamente, a rutina é a forma glicosilada da quercetina apresentando um dissacarídeo (raminose-glicose) na sua cadeia de base, mais especificamente na posição 3 do anel pirano. A rutina ocorre em algumas espécies do reino vegetal, entre elas na *Sophora japonica L., Fabaceae* (HARBORNE, 1988); *Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Gaenth., Polygonaceae: (COUCH *et al.*, 1946); *Dimorphandra mollis* Benth, Fabaceae. (CHAVES, 2003). Esta última espécie é nativa do Brasil, membro da família Caesalpinaceae e é predominante das regiões do cerrado nos estados do Para, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina (CHAVEZ, 2003).

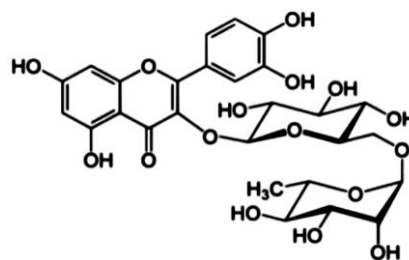


Figura 4: Estrutura química do flavonoide rutina (COSTA et al., 2016).

As propriedades farmacológicas da rutina têm sido investigadas em diversos modelos de doença *in vitro* e *in vivo* do SNC. Em estudos de isquemia cerebral, a rutina foi capaz de atenuar a apoptose neuronal isquêmica regulando o aumento de enzimas antioxidantes endógenas e reduzindo a peroxidação lipídica (KHAN *et al.*, 2009). Além disso, foi notório a recuperação sensório-motora concomitantemente à redução da neurodegeneração na periferia da lesão cortical (ORTOLANI *et al.*, 1995). No cenário da DA, diversos estudos têm confirmado o papel neuroprotetor da rutina via redução da neuroinflamação associada a inibição das EROs altamente produzida pelo acúmulo do peptídeo A β (JOACHIM e SELKOE 1992; SIMPSON *et al.*, 2010; JAVED *et al.*, 2012).

Estudos adicionais evidenciaram que a rutina também atua como agente anticonvulsivante, sendo sugerida como molécula promissora para o tratamento de pacientes com epilepsia (NIEOCZYM *et al.*, 2014). Na DP, as células do SNC são submetidas a uma carga altíssima de radicais superóxidos e aumento da neuroinflamação. Após administração da rutina, efeitos como estes pareceram ser neutralizados após observar-se um aumento da atividade das enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona (GSH) (MAGALINGAM *et al.*, 2014; MAGALINGAM *et al.*, 2016). Na discinesia tardia, condição patológica decorrente ao tratamento da esquizofrenia, por sua vez, a rutina mostrou potencial para reverter mudanças comportamentais (BISHNOI *et al.*, 2007). Ademais, este flavonoide exibiu potencial analgésico (RYLSKI *et al.*, 1979), potencial antinoceptivo (SELVARAJ *et al.*, 2014) e efeitos antiartríticos (OSTRAKHOVITCH e AFANAS'EV, 2001) em estudos *in vivo*.

Várias linhas de evidência justificaram as atividades neuroprotetoras da rutina através de sua capacidade em inibir a neuroinflamação e ativar enzimas antioxidantes *in vitro*, com consequente eliminação de espécies reativas de oxigênio e redução da peroxidação lipídica (MAGALINGAM *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2014). A estrutura química da rutina já foi associada com a capacidade da eliminação direta das EROs (HANASAKI *et al.*, 1994) e em concordância

a isto, o mecanismo de ação proposto da rutina envolve a regulação direta dos sistemas antioxidativos das células através do aumento de GSH e de enzimas de defesa oxidativa como CAT e SOD (AL-ENAZI 2014).

Em adição, um recente estudo desenvolvido no LabNq evidenciou a capacidade neuroprotetora da rutina em prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica, via proteção mitocondrial e regulação do metabolismo astrocitário (FERREIRA *et al.*, 2016). Além disso, um outro estudo do grupo relatou que o mecanismo neuroprotetor da rutina envolve a modulação da resposta inflamatória em microglia e regulação positiva do GDNF (fator neurotrófico derivado das células da glia), o qual pode estar associado ao efeito morfogênico induzido por rutina em células PC12 tratadas com LPS (lipopolissacarídeo) (SOARES *et al.*, 2018).

Diante dos resultados promissores evidenciados nos estudos acima, revela-se a necessidade da investigação mais aprofundada dos efeitos benéficos da rutina para tratamento das diversas condições patológicas, principalmente das doenças neurodegenerativas. A elucidação dos mecanismos subjacentes à neuroproteção em função da administração da rutina poderá contribuir para o entendimento da patogênese e melhor compreensão do potencial da rutina como candidato para tratamento de pacientes com distúrbios neurodegenerativos (KHAN *et al.*, 2012).

3. HIPÓTESE

A rutina gera um efeito neuroprotetor contra a exposição de células PC12 à altos níveis de glutamato.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o efeito neuroprotetor induzido pelo flavonoide rutina em células PC12 submetidas a ação excitotóxica do glutamato.

4.2 Específicos

1. Estudar o efeito direto da rutina na prevenção da neurodegeneração induzida por glutamato e alteração morfológica em culturas de linhagem de células PC12.
2. Estudar o efeito indireto da rutina na viabilidade neuronal e alteração morfológica através do uso de meio condicionado de cultura organotípica de cérebro de ratos em culturas de linhagem de células PC12.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) alocado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

5.1 MODELOS DE ESTUDO

5.1.1 Cultura de células PC12

As células PC12 são descendentes de uma linhagem clonal de feocromocitoma de glândulas suprarrenais induzidas em ratos e exibem características de células semelhantes a neurônios. Para o cultivo da linhagem celular PC12, foi utilizado meio DMEM/HAM-F12 15.6g/L (DMEM-F12, Gibco, Ref.12400-016, Grand Island, USA) suplementado com 6,25 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1,2g/L de Bicarbonato de Sódio, 33mM de glicose e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, SP, Brasil). As células foram cultivadas em placas de poliestireno 100 mm (TPP, Trasadingen, Switzerland) com troca de meio a cada 48 h até atingirem a confluência de acordo com o protocolo descrito por Dos Santos (2015). Então, as células foram descoladas da placa utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Kasvi, Brazil) a uma densidade de 7.7×10^3 células/cm² e mantidas em estufa com atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h.

Decorrido este tempo, foram realizados os tratamentos direto e indireto das células PC12. O tratamento direto consistiu na incubação das células PC12 com o glutamato (1 - 60 mM) e / ou rutina (0,5 e 50 µM) diluídos em meio sem soro e para o tratamento indireto foram utilizados meios condicionados coletados de culturas organotípicas cerebrais (MCC) tratadas com glutamato 60 mM e / ou rutina (0,5 µM) (Figura 5). Em ambos os experimentos, houve a retirada do meio de cultura DMEM/HAM-F12 no qual as linhagens estavam sendo cultivadas e adicionados os tratamentos correspondentes. Posteriormente, as culturas foram incubadas por um período de 24 horas em condições atmosféricas de 37°C e 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados em duplicata para cada grupo testado e repetidos três vezes de maneira independente.

5.1.2 Cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas

Culturas primárias de neurônios/células gliais mesencefálicas foram preparadas de acordo com o método de (ZHANG et al., 2007) modificado. Foram utilizados fetos de ratos E14 Wistar (15 - 18 dias), após as fêmeas gestantes serem anestesiadas em câmara de CO₂, sacrificadas por deslocamento da articulação atlanto-occipital e sofrerem cirurgia cesariana para retirada do útero gravídico. Os fetos foram retirados do útero, foram decapitados e os tecidos mesencefálicos ventrais foram dissecados e dissociados através de passagem forçada por uma membrana de Nitex estéril com malha de 75 µm. As células dissociadas foram suspensas em meio DMEM / HAM-F12 (Cultilab, Brasil) suplementado com glicose 1 g / L, L-glutamina a 2 mM, piruvato de sódio a 1 mM, 50 U/ mL de penicilina, 100 µg / mL de estreptomicina, 10% SFB (Cultilab) e soro de cavalo a 10% (SH) (Cultilab). Depois disso, as células foram semeadas a 5×10^5 / poço em uma placa de cultura de 24 poços pré-revestidos com poli-D-lisina (20 µg/ mL) e laminina (2,5 µg/ mL) e incubados em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C. Foram utilizadas culturas de sete dias com a composição de cerca de 55% de astroglia, 7% de microglia e 37% de neurônios, dos quais cerca de 3% eram neurônios imunorreativos à TH. O tratamento consistiu na incubação das células com DMSO (0,005%) como grupo controle e rotina a 0,5 (0,5 µM) durante 24h (Figura 5). Após isto, foram realizadas as análises morfológicas.

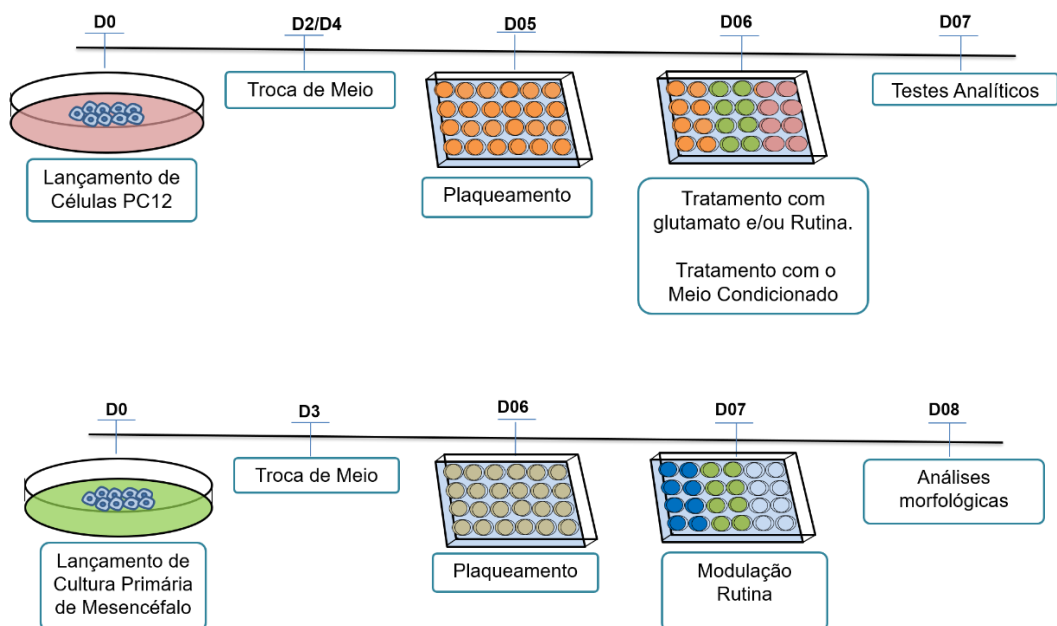


Figura 5: Desenho experimental: representação esquemática em função do tempo pela qual os diferentes tipos de cultura foram tratados com glutamato e/ou rutina ou MCC.

5.2 EXPOSIÇÃO ÀS DROGAS

5.2.1 Tratamento direto das células PC12 e da cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas com o flavonoide rutina

O flavonoide utilizado neste estudo foi adquirido do fornecedor (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO)) (98% de pureza). Para a eluição e preparo da solução estoque de rutina a uma concentração de 100 mM, empregou-se o veículo de diluição dimetilsulfóxido (DMSO Sigma, St. Louis, MO, EUA), então a droga foi armazenada em uma temperatura de 2° e 8°C, no escuro. Para obtenção das concentrações finais de trabalho utilizadas em cada grupo tratado e em cada modelo de estudo (0,5 – 50 µM), foram realizadas diluições seriadas a partir da concentração estoque de 100 mM no momento do procedimento experimental. Para o grupo controle negativo, foi utilizado o DMSO (0,005%) em meio sem soro, concentração semelhante a utilizada nos grupos tratados com o flavonoide, uma vez que esta concentração se mostrou incapaz de gerar um efeito tóxico nos parâmetros analisados quando comparado com as células que não receberam este diluente.

5.2.2 Ensaio de lesão direta das células PC12 com o glutamato

O glutamato foi adquirido do fabricante (G5667 - Sigma Chemical Co. St Louis, USA), pesado e dissolvido em meio DMEM/HAM-F12 sem soro para obtenção de uma solução estoque a 100 mM no momento do procedimento experimental. Uma vez preparada a solução estoque, foram realizadas diluições seriadas para alcançar as concentrações finais de glutamato (1 – 60 mM) utilizadas para o tratamento de cada grupo. Durante o ensaio de neuroproteção, todos os grupos, incluindo o controle negativo, foram tratados igualmente com a mesma concentração de DMSO (0,005%) utilizado nos grupos tratados com o flavonoide, que foi diluído juntamente com o glutamato no momento do tratamento da cultura PC12.

5.2.3 Tratamento indireto das células PC12 com o Meio Condicionado de Culturas Organotípicas Cerebrais (MCC) após exposição ao glutamato e rutina

A obtenção dos meios condicionados ocorreu durante a cultura organotípica de cérebro de ratos Wistar pós-natais (P7 - P9), estabelecidas e mantidas de acordo com Stoppini (1991) e colaboradores com modificações (STOPPINI et al., 1991). Este experimento foi realizado de

acordo com o número do protocolo (0272012, ICS - UFBA) do Comitê de Ética em Experimentação Animal local.

Foram realizadas a remoção dos cérebros em condições estéreis, que posteriormente foram transferidos para uma placa de poliestireno contendo meio de cultura. Para identificação da região do cérebro de cultivo exata, seguiu-se as diretrizes das coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson, 2007) e uma distância de 2.700 - 3.100 μm da porção final do bulbo olfativo e do início do córtex foi selecionada. Após isto, houve a obtenção de três fatias com uma espessura de 450 μm utilizando o aparelho Tissue Chopper McIlwain, que foram transferidas para membranas de microporos (0,4 μm ; 30mm Millicell - CM, Millipore, Beldford, MA, EUA) contidos em uma placa de poliestireno de seis poços (KASVI - K12-006) e cultivada em meio DMEM/HAM-F12, suplementado com 100 UI / mL de penicilina G, 100 μg / mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3,6 g / L HEPES, glicose 33 mM e soro fetal bovino a 10% (FBS) (Cultilab, SP, Brasil).

As fatias foram incubadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C e cultivadas por cinco dias, com troca de meio de cultura a cada 48 horas. No quinto dia as fatias foram tratadas por 24 horas com glutamato (60 mM) e / ou rutina (0,5 μM). O glutamato foi adquirido da Sigma Aldrich (G5667 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) e dissolvido em meio DMEM/HAM-F12 sem soro. A rutina foi obtida da Sigma-Aldrich com 98% de pureza e dissolvido em DMSO (não excedendo 0,005%) a uma concentração de 100 mM e armazenado no escuro a 4 ° C. Para os tratamentos, foram realizadas diluições seriadas em meio DMEM/HAM-F12 sem soro para a obtenção da concentração final (0,5 μM).

Decorrido as 24h de tratamento, o meio condicionado foi coletado em condições estéreis, centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos e armazenados em tubos cônicos tipo eppendorf de 2,0 mL a -80 °C até o momento das análises. Então, as culturas de células PC12 foram tratadas com os meios condicionados de cultura organotípica cerebral (MCC) resultantes dos tratamentos prévios com DMSO (controle negativo), glutamato (60 mM) e/ou rutina (0,5 μM) durante 24h.

5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

5.3.1 Curva concentração-resposta para o flavonoide rutina em células PC12

A curva concentração-resposta para o efeito do flavonoide rutina na viabilidade de células PC12 foi realizada através do ensaio de captação do Iodeto de Propídio (IP) nas culturas de acordo com HOPPE *et al.* (2013), com ajustes. Esta técnica é destinada a identificação de

células viáveis baseando-se na integridade da membrana plasmática das células em cultivo. Para isso, foi utilizado o corante IP, molécula que intercala em qualquer DNA quando a membrana celular está danificada. Após transcorrido o período do tratamento dos grupos com rutina nas concentrações de 0,5; 1; 5; 10 e 50 μM , durante 24 h, o sobrenadante de cada poço foi retirado para adição da solução de IP diluído em meio DMEM/HAM-F12 sem soro a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e mantida na estufa a 37°C e 5% de CO_2 durante 1 h. Decorrido este tempo, as células foram imediatamente levadas para análise em Microscópio de Fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). O IP absorve luz no comprimento de onda de 536 nm e emite a 617 nm. Nesta etapa foram captadas e analisadas pelo menos 5 imagens de cada poço, com uma média de 10 imagens obtidas em cada tratamento. Utilizou-se o software ImageJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA), para contagem das células IP^+ que apresentaram capacidade de emitir fluorescência vermelha, seguida da obtenção da porcentagem de células mortas em relação ao número total de células em cada imagem. Para as análises estatísticas, foram utilizadas as médias de cada grupo.

5.3.2 Curva concentração-resposta para o glutamato em células PC12

A curva concentração-resposta para o glutamato em células PC12 também foi realizada através do ensaio de viabilidade celular através da captação do Iodeto de Propídio (IP) nas culturas celulares foram executados de acordo com (HOPPE *et al.*, 2013), com ajustes Após transcorrido o período do tratamento dos grupos celulares com glutamato diluído em meio de cultura em concentrações que variaram de 1 à 60 mM por 24 h, o sobrenadante de cada poço foi retirado para adição da solução de IP diluído em meio DMEM/HAM-F12 sem soro a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e mantida na estufa a 37°C e 5% de CO_2 durante 1 hora. Decorrido este tempo, as células foram imediatamente levadas para análise em Microscópio de Fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). O IP absorve luz no comprimento de onda de 536 nm e emite a 617 nm. Nesta etapa foram captadas e analisadas pelo menos 5 imagens de cada poço, com uma média de 10 imagens obtidas em cada tratamento. Utilizou-se o software ImageJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA), para contagem das células IP^+ que apresentaram capacidade de emitir fluorescência vermelha, seguida da obtenção da porcentagem de células mortas em relação ao número total de células em cada imagem. Para as análises estatísticas, foram utilizadas as médias de cada grupo.

5.3.3 Ensaio de neuroproteção

Após definida as concentrações de glutamato e rutina a serem utilizadas, foram realizados os ensaios de neuroproteção através do teste de Iodeto de Propídio (IP) em culturas tratadas com glutamato e/ou rutina e os MCC, conforme descrito em item anterior.

5.3.4 Análise da morfologia celular

Para esta etapa, as culturas de células PC12 foram submetidas ao ensaio de coloração celular a partir do reagente Rosenfeld afim de analisar a morfologia das células submetidas ao tratamento com glutamato e/ou rutina e MCC. Após fixação das células com metanol gelado durante 10 minutos em temperatura de 20°C, as células foram reidratadas a partir de 2 lavagens com PBS (10 minutos cada) e, então, foram adicionadas 15 gotas do reagente Rosenfeld sobre as células por 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos cada. Após secar em temperatura ambiente, as células foram examinadas no Microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) em objetiva de 20x e fotografadas com Câmera Leica (DFC7000 T com o software Leica Application Suite). Foram obtidas 5 fotos de campos diferentes para cada poço totalizando uma média de 10 fotos para cada tratamento. A análise morfológica concentrou-se na contagem de células que apresentaram morfologia bipolar, emissão de prolongamento, amebóide e esférica. Foi gerado o percentual de células com morfologia não habitual em relação ao número total de células em cada imagem. Em adição, realizou-se as medições do comprimento de neuritos e a contagem dos pontos de ramificações das células utilizando o software ImageJ/NeuronJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA), de acordo com instruções de Pemberton (2018). Foram medidos aproximadamente 18 neuritos visivelmente maiores de cada fotomicrografia e gerado as médias do comprimento médio de neuritos para cada tratamento. O mesmo foi realizado para a análise dos pontos de ramificação das células. Consideramos as 18 células de cada fotomicrografia que visivelmente emitiam maior número de prolongamentos. Após contagem dos pontos de ramificação, foram geradas as médias para cada experimento independente.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

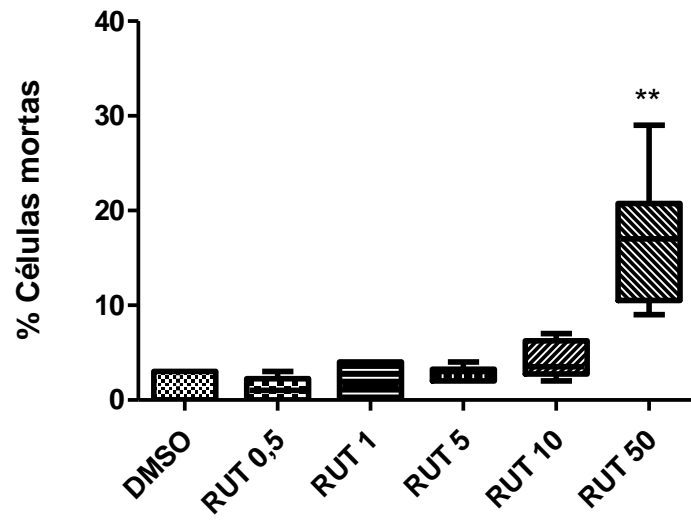
Para cada análise, foram realizados três experimentos independentes, cada um com amostragem em duplicata. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (California, EUA) e registrados como média ou mediana dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos, a distribuição normal e a homogeneidade da variação dos dados foram testadas pelo teste de normalidade do ônibus Kolmogorov - Smirnov ou D'Agostino & Pearson e testes Levene, respectivamente. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas através do teste One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey's Multiple Comparison Test. Para dados não-paramétricos, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis test e pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1 SCREENING DE CITOTOXICIDADE DA RUTINA EM CULTURAS DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12

O teste de viabilidade celular para a cultura de células PC12 após tratamento de 24h com a rutina nas concentrações de 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM e 50 μM foi determinado através do teste IP (Figura 6). De acordo com os resultados obtidos, a concentração a 50 μM foi a única que apresentou toxicidade celular estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo. Para os ensaios de neuroproteção, decidiu-se seguir trabalhando com as concentrações a 0,5 μM e 1 μM , pois, de acordo com os resultados prévios, estas são consideradas as menores concentrações capazes de induzir efeitos neuroprotetores observados *in vitro* para cultura de linhagem celular, além das razões de viabilidade e de custo.

A



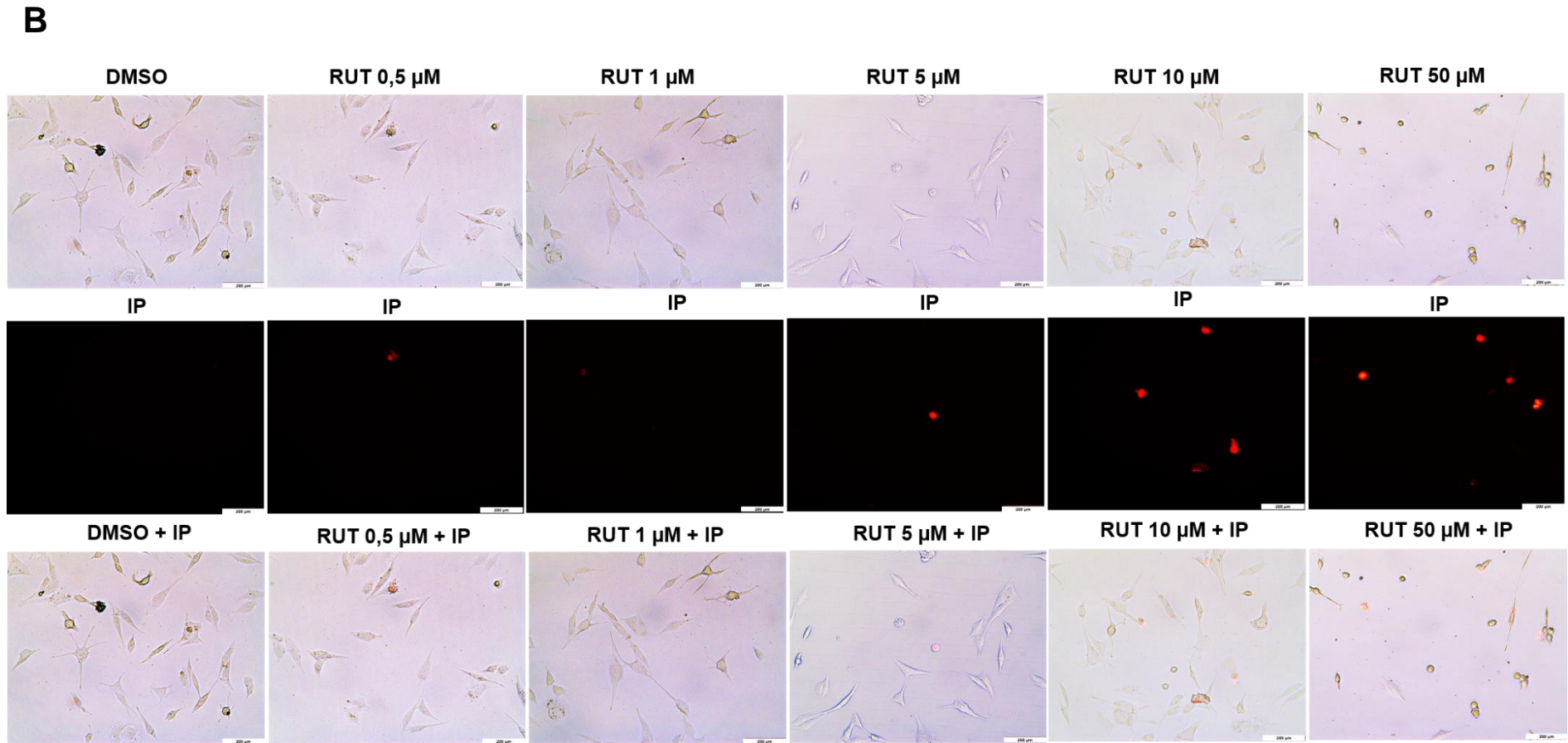
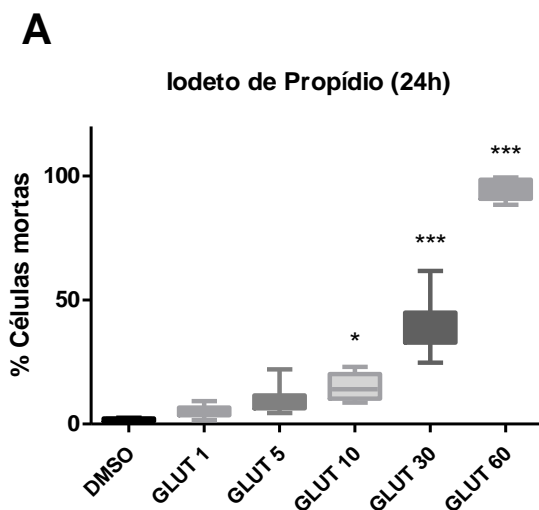


Figura 6: Avaliação do efeito das diferentes concentrações da rutina para a viabilidade de células PC12. (A) Percentual do número de células mortas determinada a partir do ensaio de IP após 24h de tratamento com as concentrações de 0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 50 μ M da rutina em relação ao grupo controle DMSO. Análise estatística: One way/ANOVA/Kruskal-Wallis test GraphPad Prism. ** $p < 0.01$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle. (B) Fotomicrografias obtidas do microscópio de fluorescência invertido exibindo a marcação das células mortas por emissão de fluorescência vermelha para as concentrações de rutina testadas. O DMSO foi utilizado como controle negativo. Aumento de 20x.

6.2 SCREENING DE CITOTOXICIDADE DO GLUTAMATO EM CULTURAS DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12

O efeito do dano citotóxico induzido pelo glutamato nas concentrações de 1 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM e 60 mM sob a viabilidade de células da linhagem PC12 em cultivo foi determinado a partir do teste de incorporação do IP 24 h após o tratamento em condições comparativas ao controle negativo (cultura sem o glutamato). Os resultados demonstraram que o glutamato não apresentou toxicidade significativa nos grupos tratados com as concentrações a 1 mM (5%, mediana) e 5 mM (7,7%, mediana). Em contrapartida, o percentual de morte induzida pelo glutamato foi estatisticamente significativo nos grupos com glutamato a 10 mM (14%, mediana), 30 mM (37,7%, mediana) e 60 mM (92,6 %, mediana), havendo aumento considerável e gradual do número de células IP positivas quando comparado ao grupo controle DMSO (0,001%) (2.0% mediana) (Figura 7A). À vista disso, selecionamos estas três últimas concentrações para os ensaios de neuroproteção direta com a rotina nas culturas de linhagem celular PC12.

Ademais, foi possível também já observar alterações morfológicas nos ensaios que receberam as concentrações mais altas de glutamato, 10 mM, 30 mM e 60 mM (Figura 7B), sendo que estas mudanças eram dependentes da concentração do glutamato. As células da linhagem PC12 em condições controle (DMSO 0,001%) apresentam morfologia bipolar, com membranas uniformes e mais fusiformes. Em condições de excitotoxicidade glutamatérgica induzida pelo tratamento a 10 mM, 30 mM e 60 mM, as células passaram a exibir uma morfologia atípica caracterizada por corpos celulares retraídos, mais arredondados e disformes. Esta alteração foi mais frequente no grupo com glutamato a 60 mM, que também apresentou uma diminuição acentuada da viabilidade celular evidenciada pela marcação do IP.



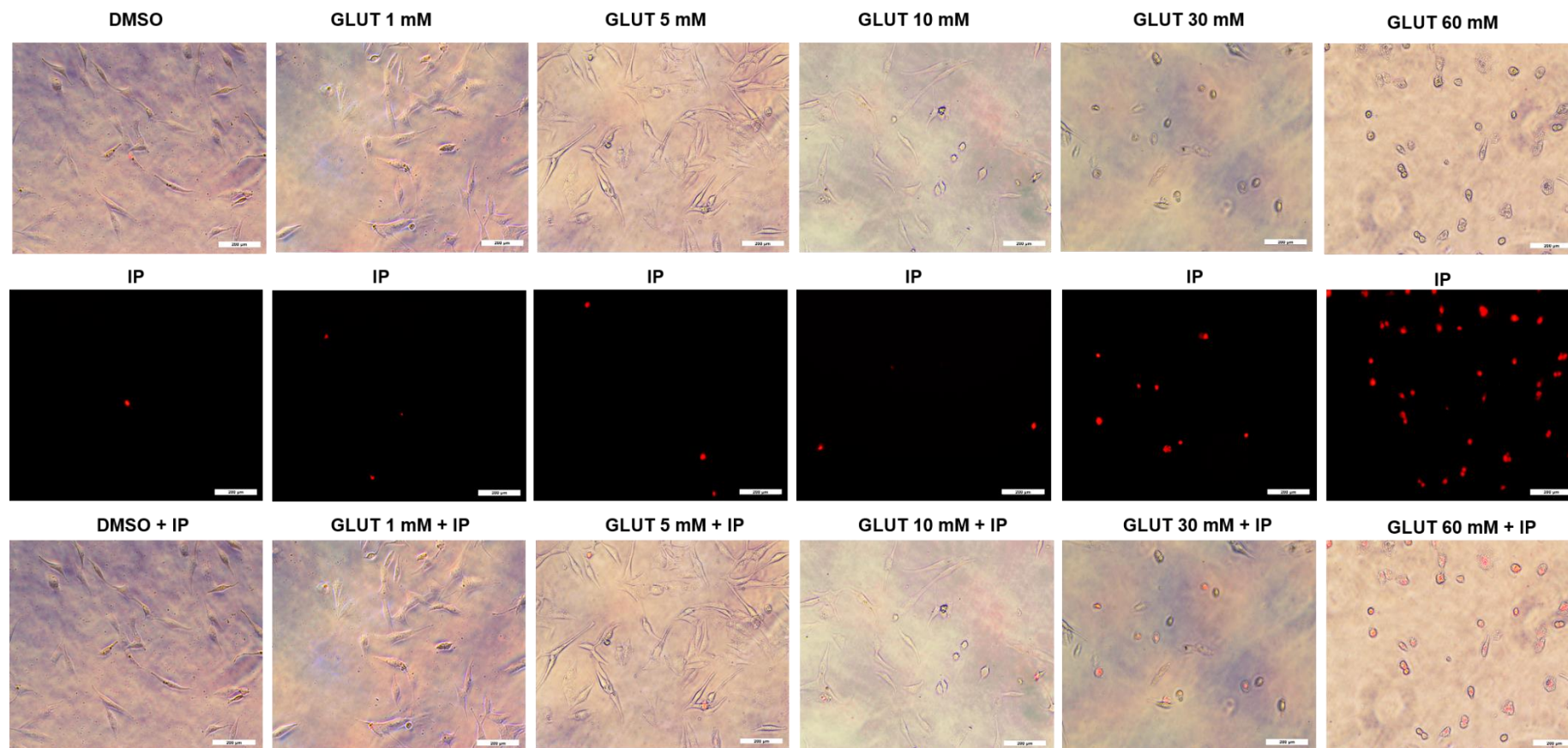
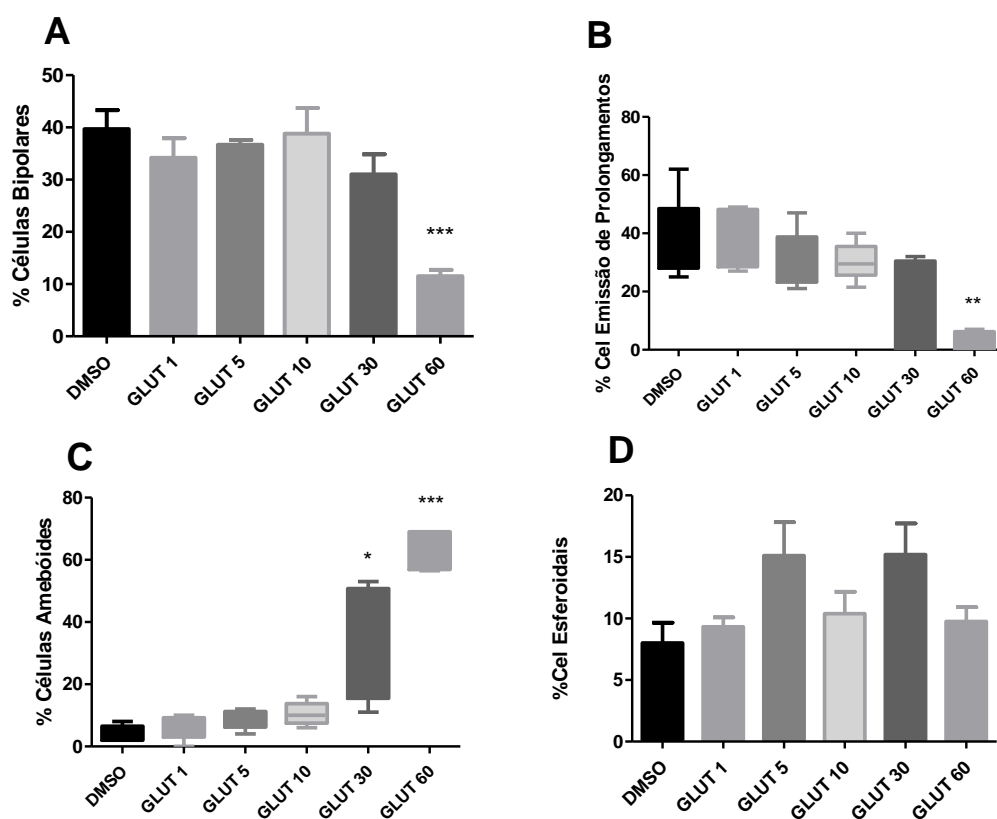
B

Figura 7: Avaliação do efeito das diferentes concentrações do glutamato para a viabilidade de células PC12. Proporção do número de células mortas foi determinada a partir da positividade das células para a técnica do iodeto de propídio/número total de células por campo fotografado. (A) análise estatística da porcentagem de células mortas para as contrações de glutamato 1 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM e 60 mM após 24h de tratamento. * $p < 0.05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle, *** $p < 0.001$, representa diferença estatística em relação ao grupo controle. Análise estatística: One way/ANOVA/Kruskal-Wallis test GraphPad Prism. B) Fotomicrografias obtidas do microscópio de fluorescência invertido exibindo a marcação das células mortas por emissão de fluorescência vermelha para as concentrações de glutamato testadas. O DMSO foi utilizado como controle negativo. Aumento de 20x.

6.2.1 Glutamato induz mudança morfológica atípica em cultura de células PC12

Em adição, realizamos o teste de coloração por Rosenfeld para o grupo controle negativo (DMSO 0,005%) e para os ensaios de lesão com glutamato a 1 - 60 mM. Observamos que o grupo do glutamato a 60 mM apresentou uma menor porcentagem do número de células com morfologia bipolar $11.50 \pm 1.23\%$, com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle negativo $39.67 \pm 3.65\%$ (Figura 8A e E). Da mesma forma, o modelo de lesão com o glutamato a 60 mM (0,0 %, mediana) provocou uma diminuição estatisticamente significativa do número de células com emissão de prolongamentos quando comparado ao grupo controle (36%) (Figura 8B e E). Em contrapartida, foi possível notar que houve um aumento gradual do número de células com morfologia amebóide com diferença estatística nos grupos GLUT30 (22%, mediana) e GLUT60 (61,5 %, mediana) quando comparado ao grupo controle (3,5%, mediana) (Figura 8C e E). Por outro lado, não foi encontrada diferença estatística quanto ao aparecimento de células com morfologia esferoideal nos grupos testados (Figura 8D).



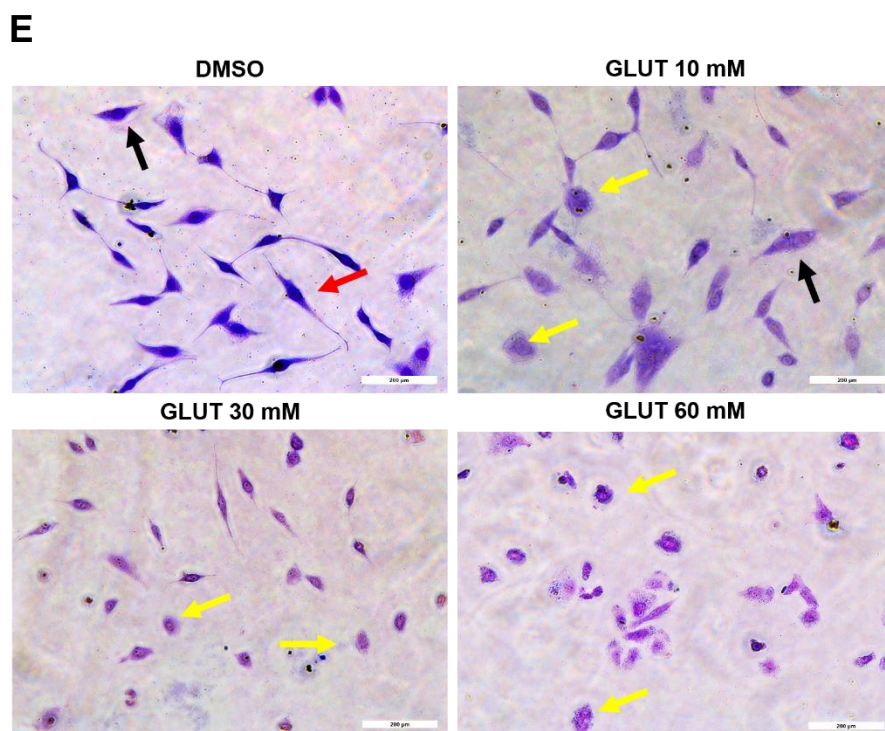


Figura 8: Avaliação morfológica das células da linhagem PC12 após ensaio de lesão com o glutamato. A), B), C) e D) representam a proporção da porcentagem de células que apresentaram morfologias variadas sob diferentes concentrações de glutamato comparadas ao grupo controle. A) % de células com morfologia bipolar, B) % células apresentando emissão de prolongamentos, C) % células com morfologia ameboide e D) % células com morfologia esferoidal. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.0001$, representam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. Análises estatísticas: One way/ANOVA/Kruskal-Wallis test e ANOVA/Tukey's Multiple Comparison Test. Em E) estão fotomicrografias representativas das células da linhagem PC12 com diferentes morfologias 24h após o tratamento com glutamato a 10 mM, 30 mM e 60 mM, comparadas ao grupo controle negativo. Células com morfologia poligonal estão representadas com setas pretas; seta vermelha indica células com emissão de prolongamentos; setas amarelas indicam as células ameboides. Coloração de Rosenfeld, aumento de 20x.

6.3 RUTINA NÃO APRESENTOU EFEITO NEUROPROTETOR EM CULTURA DE CÉLULAS PC12 APÓS DANO INDUZIDO COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GLUTAMATO.

Após 24h do tratamento direto da cultura de células da linhagem PC12 com a rotina a 0,5 μM e 1 μM e o glutamato nas concentrações de 10 mM, 30 mM e 60 mM determinamos a porcentagem de células que apresentaram capacidade em incorporar o IP comparado ao grupo controle negativo (DMSO 0,005%). Observamos que nos grupos GLUT10 + RUT0,5 (3.5% mediana) e GLUT10 + RUT1 (5.0% mediana), o glutamato apresentou baixa citotoxicidade para as células PC12 após as 24 h de tratamento comparado ao grupo GLUT 10 (6.0 % mediana) e

ao grupo controle (2.0 % mediana), o qual não apresentou diferença estatística em relação ao número de células mortas (Figura 9A). Por outro lado, a rutina não foi capaz de proteger a cultura de células PC12 nos grupos GLUT30 + RUT0,5 (20.0% mediana) e GLUT30 + RUT1 (19.0% mediana) (Figura 9B), quando comparado ao grupo GLUT30 mM (24,0% mediana) e/ou comparado ao grupo controle negativo (2.0% mediana). O mesmo foi observado nos grupos tratados com glutamato a 60 mM (100,0 % mediana), onde a rutina não foi capaz de manter as células PC12 viáveis nos grupos GLUT60 + RUT0,5 (100,0 % mediana) e GLUT60 + RUT1 (100,0 % mediana), apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (2.0% mediana) (Figura 9C).

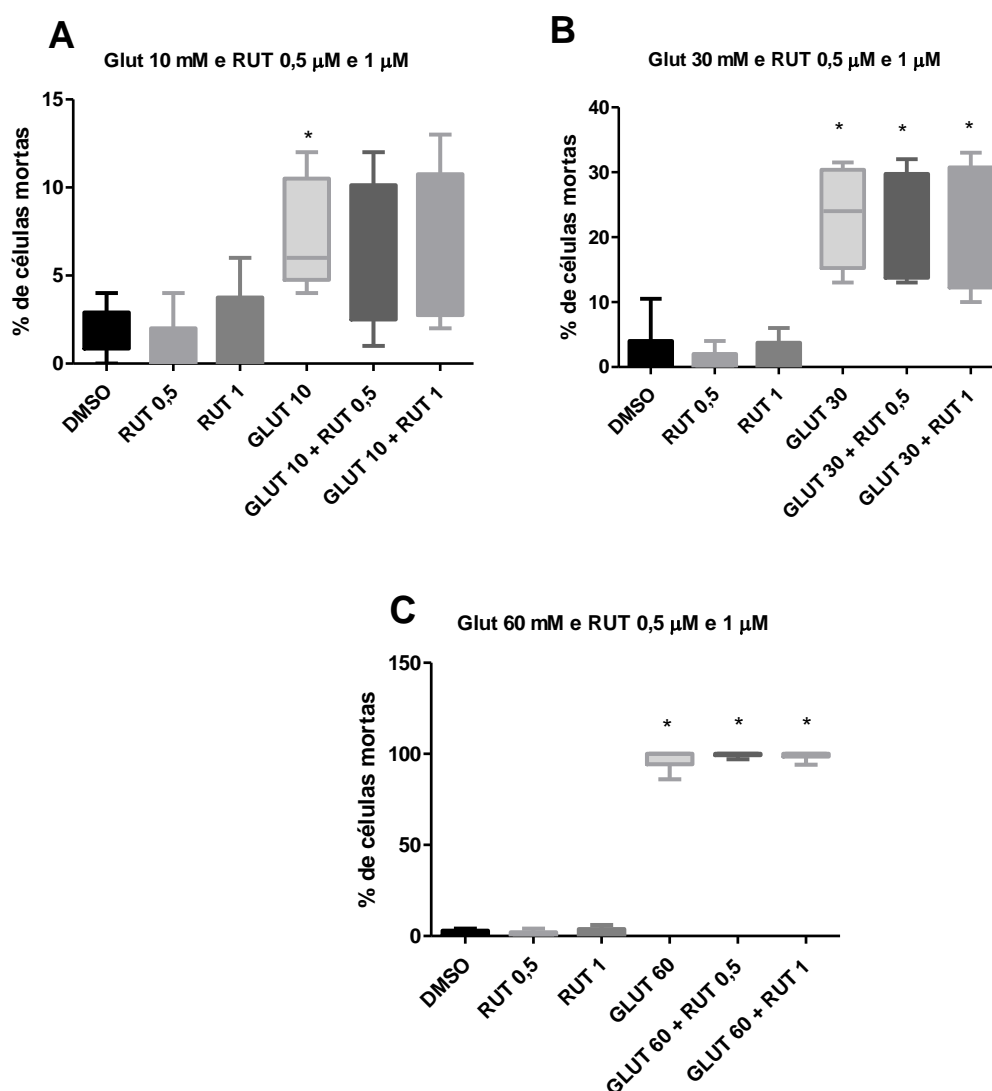


Figura 9: Análise do efeito neuroprotetor direto da rutina contra a toxicidade do glutamato para células PC12. Os grupos RUT0,5 e RUT1 não apresentaram toxicidade celular quando comparado ao grupo controle DMSO 0,001% em nenhum tratamento. A) os grupos GLUT10+RUT0,5 e GLUT10+RUT1 induziram menos toxicidade celular quando comparado ao grupo GLUT 10 mM. B) os grupos GLUT30+RUT0,5 e GLUT30+RUT1 não apresentaram diminuição do número de células IP positivas

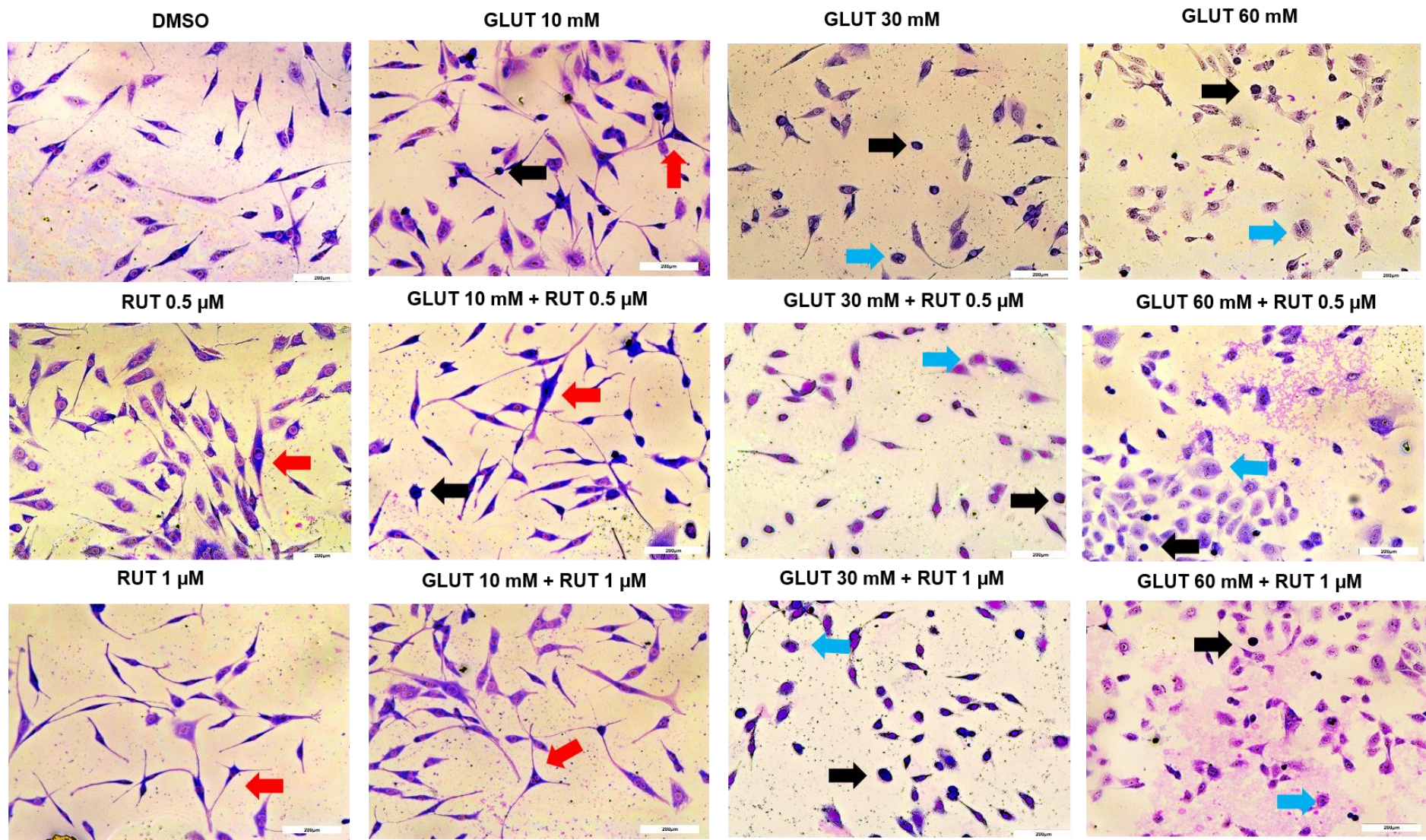
quando comparado ao grupo tratado com glutamato a 30 mM. C) os grupos GLUT60+RUT0,5 e GLUT60+RUT1 também não demonstraram diminuição do número de células IP positivas quando comparado ao grupo tratado com glutamato a 60 mM. * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação às culturas em condições controle. A análise de variância foi realizada usando One-way Anova/Kruskal-Wallis test GraphPad Prism.

6.3.1 Rutina não foi capaz de inibir a mudança morfológica atípica das células PC12 nos grupos com alta concentração de glutamato.

Através do teste de coloração por Rosenfeld realizado nos grupos controle negativo, GLUT 10 mM, GLUT 30 mM, GLUT 60 mM e RUT 0,5 μ M e RUT 1 μ M, foi possível observar as alterações morfológicas induzidas por cada ensaio. O grupo GLUT 60 mM ($10.17 \pm 4,41\%$) apresentou diminuição estatisticamente significativa do número de células com morfologia bipolar quando comparado ao grupo controle negativo ($35.55 \pm 3.15\%$). A mesma diferença estatística foi observada nos grupos GLUT60 + RUT0,5 ($11,50 \pm 2.18\%$) e GLUT 60 + RUT1 ($12,83 \pm 1.30\%$) (Figura 10B), demonstrando que a rutina foi incapaz de manter as células com sua morfologia habitual. Isso justifica o baixo número de células PC12 com emissão de prolongamentos observados nos grupos GLUT60 + RUT0,5 (2.5% mediana) e GLUT60 + RUT1 (2.5% mediana) com morfologias disformes semelhantes ao grupo GLUT 60 (2.0% mediana), comprovando que a rutina não exerceu efeito neuroprotetor associado à formação de finos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 10 C).

Da mesma maneira, foi observado que a rutina em ambas concentrações não apresentou efeito inibitório da morfologia celular amebóide e/ou esferoidal em cultura PC12. Os grupos GLUT60 + RUT0,5 (58.0% mediana) e GLUT60 + RUT1 (57.0% mediana) apresentou aumento do número de células com morfologia amebóide caracterizada por retração do corpo celular e membrana disforme, o mesmo observado no grupo GLUT60 (60.0% mediana), com diferença estatística quando comparado ao grupo controle negativo (0.0% mediana) (Figura 10D). De forma semelhante, a rutina não foi capaz de inibir a mudança morfológica de células bipolares para esferoidais, observadas nos grupos GLUT30 + RUT0,5 ($28,00 \pm 4.72\%$) e GLUT30 + RUT1 ($28,67 \pm 3.36\%$) comparado ao grupo controle negativo ($3,650 \pm 1.14\%$) e ao GLUT30 ($24,17 \pm 3.06\%$). O mesmo foi observado com os grupos GLUT60 + RUT0,5 ($18,50 \pm 2.56\%$) e GLUT60 + RUT1 ($18,67 \pm 2.21\%$), apresentando diferença estatística quando comparado ao grupo controle negativo ($3,650 \pm 1.14\%$) (Figura 10 E).

A



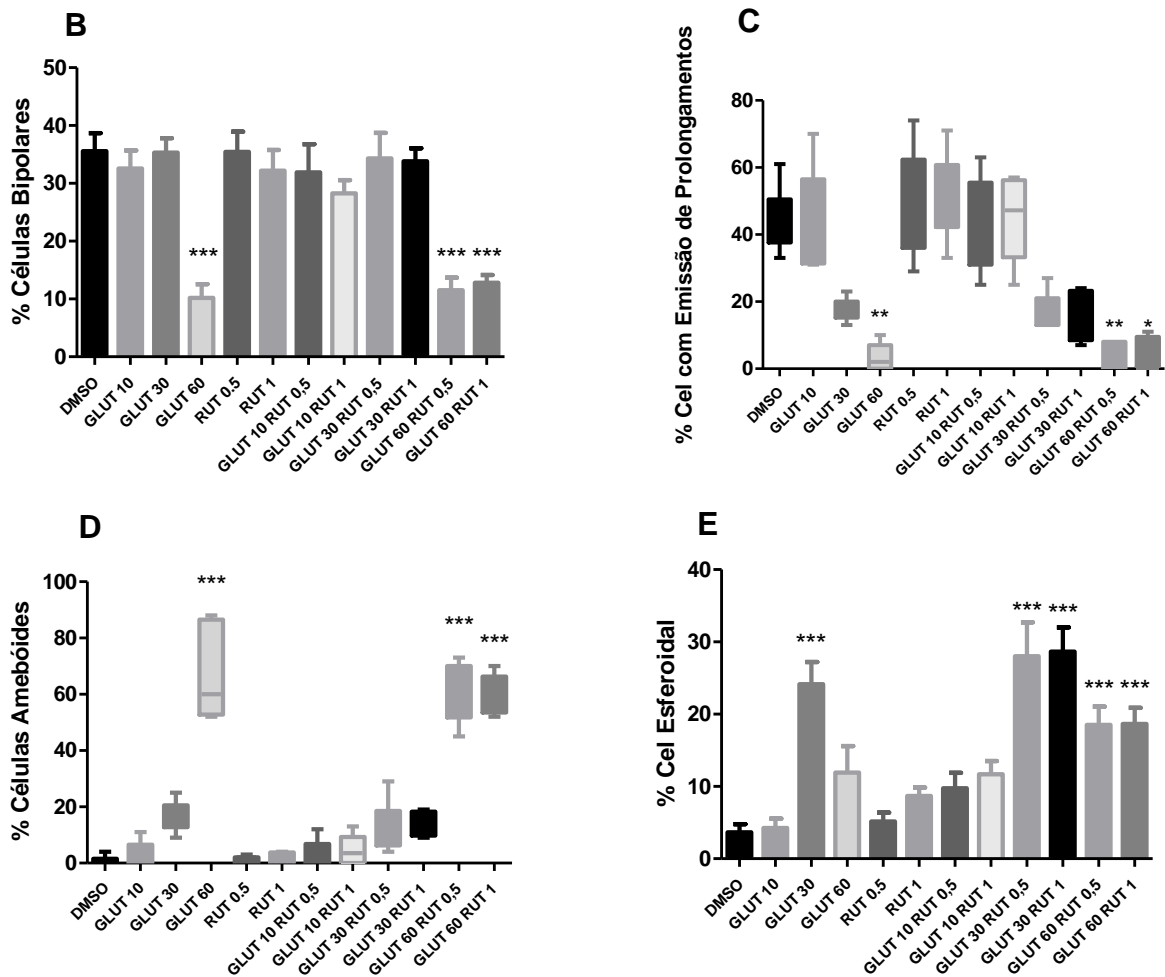


Figura 10: Análise morfológica da cultura de célula PC12 após 24h do ensaio de neuroproteção da rotina contra toxicidade do glutamato. A) fotomicrografias da linhagem celular após 24h de tratamento com DMSO, glutamato (10 mM, 30 mM, 60 mM) e/ou rutina (0,5 μ M e 1 μ M) evidenciando as mudanças morfológicas celulares de acordo a cada tratamento. As setas pretas indicam células com morfologia esferoidal; as setas vermelhas são células com emissão de finos prolongamentos; e as setas azuis apontam células com morfologia amebóide. Aumento 20x. B), C) d) e E) representam a porcentagem de células com morfologia poligonal, emissão de prolongamento, amebóide e esferoidal, respectivamente, em cada grupo tratado. A análise de variância foi realizada usando o One-way Anova e pós-teste Tukey's para múltipla comparação e One-way Anova/Kruskal-Wallis test para dados não paramétricos através do programa GraphPad Prism. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; e *** $p < 0,001$ representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle DMSO.

6.3.2 Rutina não foi capaz de alterar o comprimento médio de neuritos nas células PC12 nos grupos com alta concentração de glutamato.

Após a mediação do comprimento médio de neuritos das células PC12 tratadas com glutamato (10, 30 e 60 mM) e rutina (0,5 e 1 μ M) após 24 h do ensaio de neuroproteção,

constatamos que a rutina não foi capaz de causar alterações no comprimento dos prolongamentos citoplasmáticos das células. Observamos que o grupo GLUT30 + RUT0,5 ($56,99 \pm 6,1$ %) e o grupo GLUT30 + RUT1 ($50,71 \pm 3,0\%$) apresentaram comprimento médio de neuritos estatisticamente diminuídos em comparação as células PC12 sob condições controle DMSO ($99,51 \pm 17,79\%$). O mesmo ocorreu com o grupo GLUT60 + RUT0,5 ($15,44 \pm 2,6\%$) e o grupo GLUT60 + RUT 1 ($14,10 \pm 1,3\%$) (Figura 11).

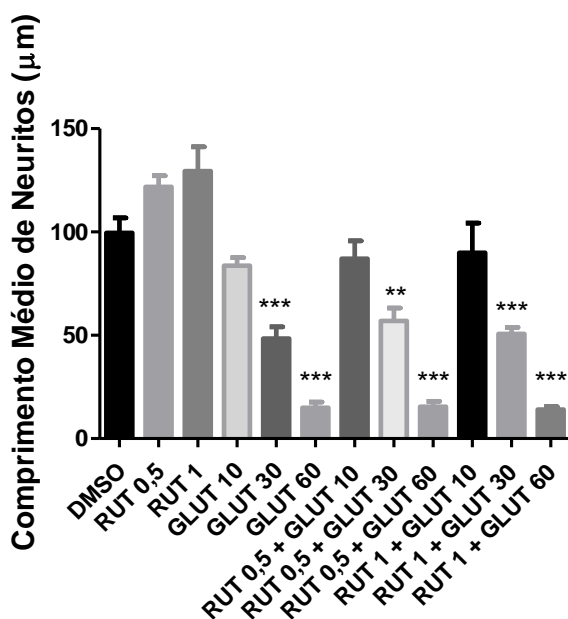
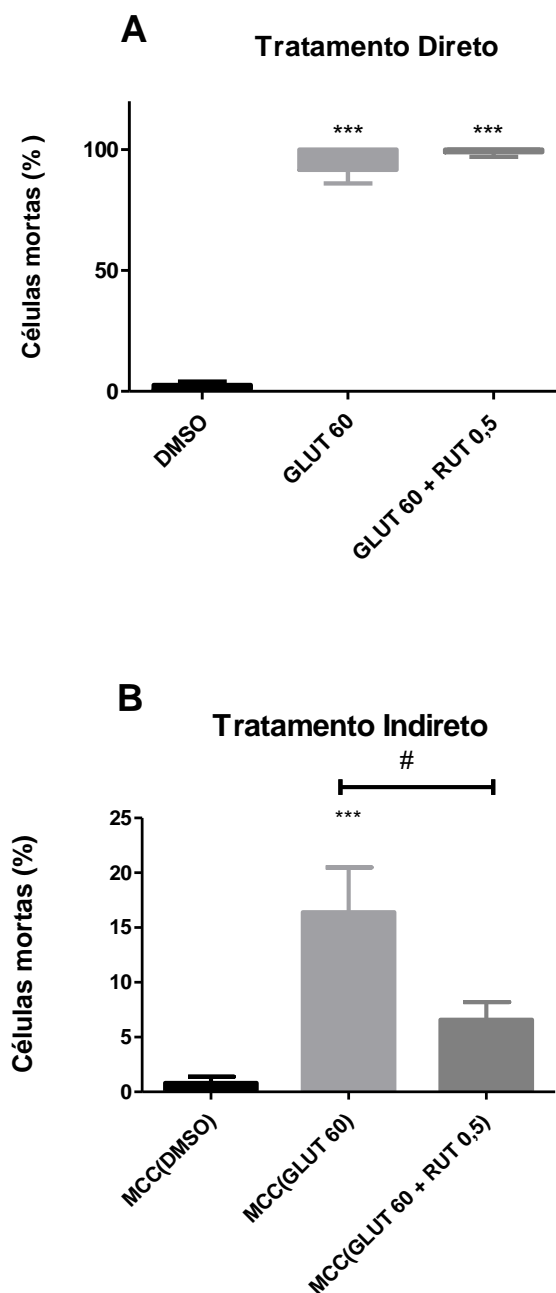


Figura 11: Análise do comprimento médio de neuritos das células PC12 após 24h do ensaio de neuroproteção da rutina contra toxicidade do glutamato. A análise de variância foi realizada usando o One-way Anova e pós-teste Tukey's para múltipla comparação através do programa GraphPad Prism. **p < 0,001; e ***p < 0,001 representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle DMSO.

6.4 MEIO CONDICIONADO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE CÉREBRO COM GLUTAMATO E/OU RUTINA INDUZIU BAIXA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS PC12

A análise da viabilidade celular para a cultura de células PC12 utilizando MCC (GLUT60 e GLUT60+RUT0,5) foi determinado através do teste de captação pelo IP 24h após os tratamentos. A partir dos resultados obtidos observamos que, enquanto o tratamento direto não induziu neuroproteção para as células PC12 no grupo tratado com GLUT60 + RUT0,5 (100% de mortes para a cultura) (Figura 12A), o grupo MCC (GLUT60) ($16,40 \pm 4,0\%$) e o

grupo MCC (GLUT60 + RUT0,5) ($6,5 \pm 1,6$ % mediana) não foram citotóxicos para as células PC12, havendo uma redução significativa do número de células positivas para o IP (Figura 12B e C). Em adição, quando comparamos o grupo MCC (GLUT60) com o controle MCC (DMSO) ($0,8 \pm 0,5$ % mediana), percebemos uma diferença estatisticamente significativa no número de células mortas, que não foi evidenciado quando o MCC estava suplementado com RUT $0,5 \mu\text{M}$. Foi notório também uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo MCC (GLUT60) e o grupo MCC (GLUT60 + RUT0,5), evidenciando portanto, um potencial efeito neuroprotetor da rutina não observado no tratamento direto.



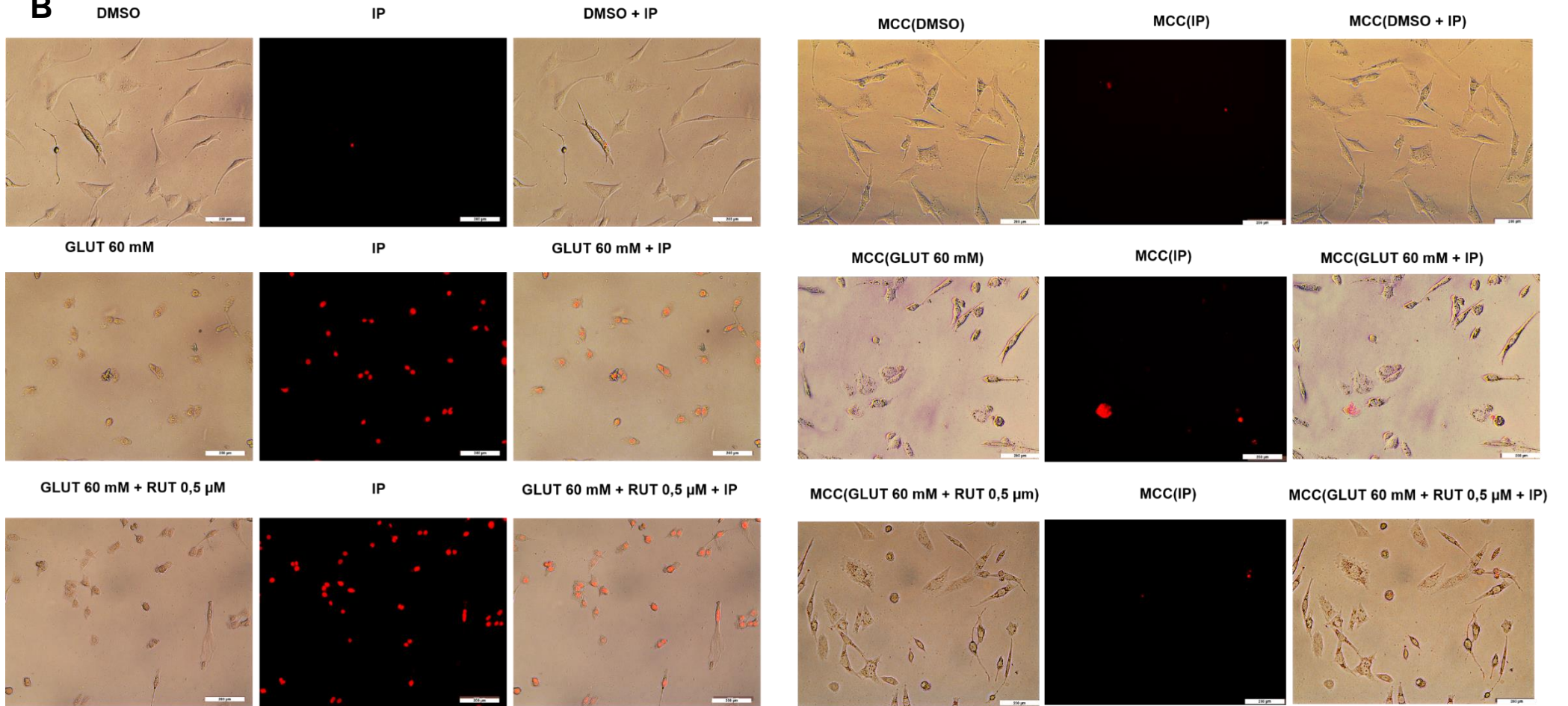
B

Figura 12: Avaliação comparativa da viabilidade das células PC12 após ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24h. A) análise estatística da porcentagem de células mortas após 24h de tratamento direto para o grupo controle DMSO, GLUT60 e GLUT60 + RUT0,5; e tratamento indireto para o grupo controle MCC(DMSO), MCC(GLUT60) e MCC (GLUT60 + RUT0,5). A análise de variância foi realizada usando o One-way Anova e pós-teste Tukey's para múltipla comparação e One-way Anova/Kruskal-Wallis test para dados não paramétricos através do programa GraphPad Prism. *** $p < 0.0001$, representa diferença estatística em relação ao grupo controle DMSO. # $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação às culturas expostas ao MCC(GLUT60+RUT0,5). B) Fotomicrografias obtidas do microscópio de fluorescência invertido exibindo a marcação das células mortas por emissão de fluorescência vermelha para os diferentes grupos tratados. Aumento de 20x.

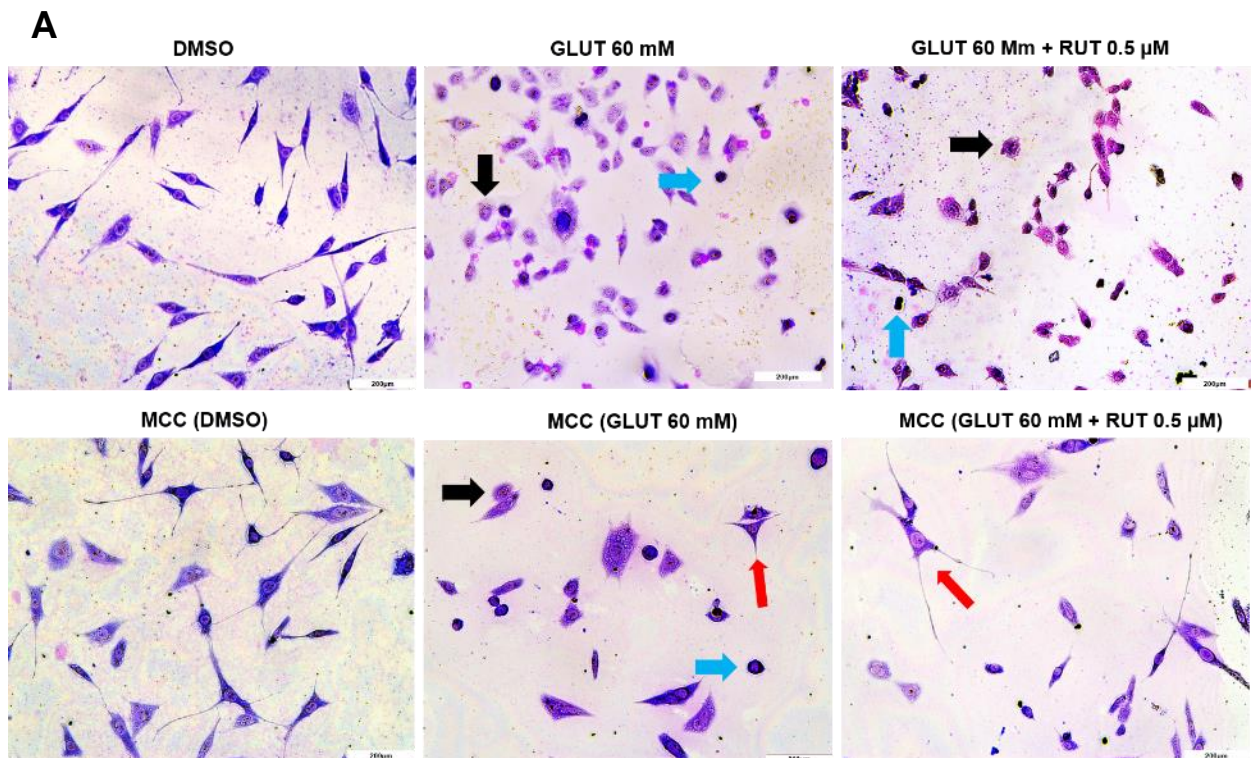
6.4.1 Meio condicionado de cultura organotípica de cérebro tratada com glutamato e rutina induziu baixas alterações morfológicas em cultura de células PC12

Após realização da técnica de coloração por Rosenfeld, observamos que culturas de células PC12 em condição controle negativo, tratadas com MCC DMSO apresentou porcentagem de células bipolares, células com emissão de prolongamentos e células amebóides semelhantes ao grupo DMSO do tratamento direto (Figura 13B). Em relação ao número de células com morfologia bipolar presente nos grupos MCC(GLUT 60) (32.75 % mediana) e MCC(GLUT 60 + RUT0,5) (39.00 % mediana), notamos que o ambos os tratamentos não induziram mudança morfológica estatisticamente significante quando comparado aos controles negativos DMSO (37.25 % mediana) e MCC(DMSO) (32.00 % mediana), diferentemente dos grupos que receberam o tratamento direto GLUT 60 (10.00 % mediana) e GLUT60+RUT0,5 (11.00 % mediana). O grupo GLUT60 (10.00 % mediana) e o grupo GLUT60+RUT0,5 (11.00 % mediana) do tratamento direto apresentou proporção de células bipolares diminuída com diferença estatística ao compararmos ao grupo MCC(GLUT60 + RUT0,5) (39.00 % mediana). Isto evidencia, portanto, a capacidade do meio condicionado suplementado com rutina em manter o número de células com morfologia poligonal em cultura de células PC12.

No entanto, ao observar o número de células com capacidade em emitir prolongamentos citoplasmáticos na cultura de células PC12 em todos os grupos experimentais testados (direto e indireto) houve diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo DMSO ($48,33 \pm 4.04\%$) do tratamento direto. Por outro lado, quando comparamos esses mesmos grupos ao controle do tratamento indireto MCC(DMSO) ($35,33 \pm 5.21\%$), o grupo MCC(GLUT60 + RUT0,5) ($26,75 \pm 2.39\%$) não apresentou diferença estatística. Em adição, o tratamento MCC(GLUT60 + RUT0,5) demonstrou um aumento estatisticamente significante da proporção de células com emissão de finos prolongamentos quando comparado ao grupo

GLUT 60 ($3,333 \pm 1.60 \%$) do tratamento direto. Podemos sugerir, portanto, que o tratamento com meio condicionado suplementado com rutina ($0,5 \mu\text{M}$) foi capaz de induzir alterações morfológicas na cultura de células PC12 que passaram a emitir prolongamentos citoplasmáticos mesmo na presença do glutamato (Figura 13 A-F).

Considerando a presença de células PC12 com morfologia ameboide nos tratamentos testados, notamos que os grupos MCC(GLUT 60) (15,75% mediana) e MCC(GLUT60 + RUT0,5) (11,5 % mediana), induziu menores alterações para este fenótipo quando comparado aos grupos do tratamento direto GLUT60 (60.00 mediana) e GLUT60+RUT0,5 (58% mediana). Ademais, não encontramos diferença estatística neste parâmetro avaliado quando comparamos os grupos MCC(GLUT60) e MCC(GLUT60+RUT0,5) aos grupos controles direto DMSO (0,5% mediana) e indireto MCC(DMSO) (5,5%). Em relação ao número de células com morfologia esferoidal, foi observado que os grupos do tratamento indireto MCC(GLUT60) ($28,08 \pm 3.90\%$) e MCC(GLUT60+RUT0,5) ($17,50 \pm 3.75\%$) demonstraram um aumento considerável desta morfologia celular estatisticamente significativa em relação grupo controle DMSO ($3,650 \pm 1.14\%$). Uma diferença estatística entre o número de células esferoidais presentes no grupo MCC(GLUT60) e no grupo GLUT 60 ($12,75 \pm 3.16\%$) também foi observado.



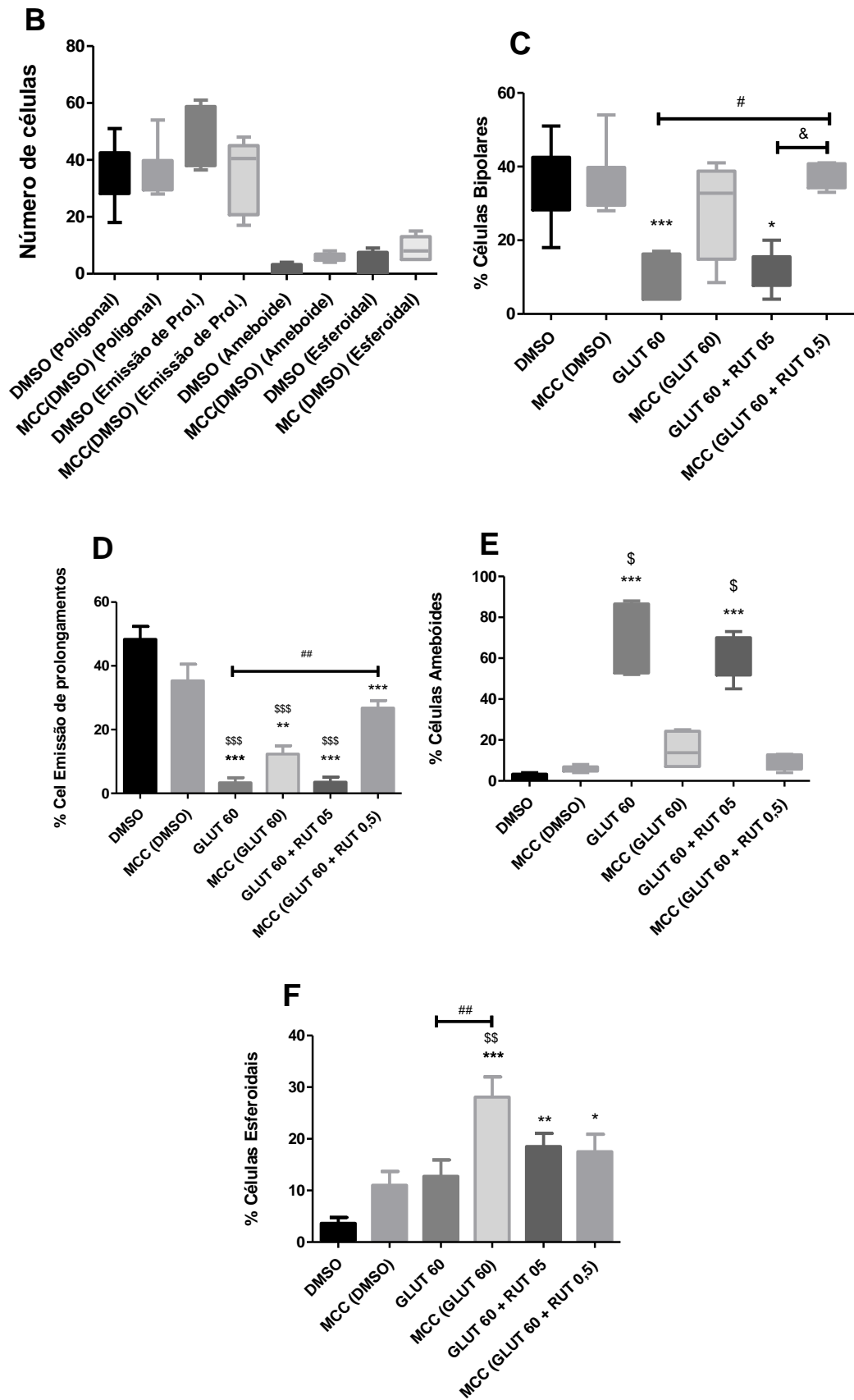


Figura 13: Análise morfológica comparativa das células PC12 após o ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24h. Análises morfológicas em culturas de célula PC12 tratadas com

MCC(GLUT60) e MCC(GLUT60 + RUT0,5) durante 24h comparado ao tratamento direto GLUT60 e GLUT60+RUT0,5. Em A, fotomicrografias evidenciando as diferentes morfologias de células PC12 de acordo a cada tratamento através da coloração de Rosenfeld. As setas pretas apontam a morfologia amebóide em cultura de PC12, as setas em azul mostram a morfologia esférica e as setas em vermelho apontam as células com emissão de prolongamentos e contração de corpo celular em cultura de PC12. Em B) está a comparação da porcentagem de células com as diferentes morfologias entre os grupos controles DMSO e MCCDMSO. C), D), E) e F) temos a análise da relação células PC12 com morfologia poligonal, com emissão de prolongamentos, amebóides e esféricos respectivamente. A análise de variância foi realizada usando o One-way Anova e pós-teste Tukey's para múltipla comparação e One-way Anova/Kruskal-Wallis test para dados não paramétricos através do programa GraphPad Prism. *p < 0,05; **p < 0,001; e ***p < 0,0001 representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle DMSO. \$p < 0,05, \$\$p < 0,001; \$\$\$p < 0,0001 representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle MCC (DMSO). #p < 0,05; ##p < 0,001 representam diferenças estatísticas em relação em relação às culturas expostas a 60 mM de glutamato. &p < 0,05 representa diferença estatística em relação às culturas expostas ao glutamato 60 + rutina 0,5.

6.4.2 Meio condicionado de cultura organotípica de cérebro com glutamato e/ou rutina induziu aumento de pontos de ramificações e aumento do comprimento médio de neuritos nas células PC12

Foram realizadas as análises de medição do comprimento dos neuritos e contagens de pontos de ramificação usando o software ImageJ e NeuronJ para os tratamentos direto e indireto de células PC12. Em relação ao comprimento médio de neuritos (Figura 14 A), observamos que todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle do tratamento direto DMSO ($99,51 \pm 7,2\%$) e do controle indireto MCC DMSO ($78,56 \pm 11,8\%$). Isto evidencia que nenhum grupo apresentou comprimento de neuritos habitual. No entanto, é notório o aumento estatisticamente significante do comprimento médio de neuritos na cultura de células PC12 do grupo MCC RUT 0,5 + GLUT 60 ($48,85 \pm 6,0\%$) quando comparado aos grupos do tratamento direto GLUT 60 ($14,91 \pm 2,7\%$), RUT 0,5 + GLUT 60 ($15,44 \pm 2,6\%$).

A contagem dos pontos de ramificações (Figura 14 B) evidenciou que os grupos do tratamento direto GLUT 60 ($2,66 \pm 0,5$), RUT 0,5 + GLUT 60 ($3,50 \pm 1,1$) e o grupo MCC GLUT 60 ($11,60 \pm 1,1$) apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparado aos controles do tratamento direto DMSO ($31,50 \pm 1,8$) e indireta MCC DMSO ($26,90 \pm 2,9$). Vale reiterar que apesar do grupo MCC GLUT 60 não ter apresentado o número de pontos de ramificações próximo do habitual, notamos que as células PC12 deste grupo ainda assim emitiam mais pontos de ramificações com diferença estatística quando comparado a ambos os grupos do tratamento direto. No caso do grupo que recebeu o meio condicionado suplementado com rutina (MCC RUT 0,5 + GLUT 60 ($24,00 \pm 2,3$), a diferença foi ainda maior, uma vez que não houve diferenças estatísticas quando comparado os grupos controle direto e indireto e

principalmente por apresentar diferença estatisticamente significativa quando comparado aos outros grupos.

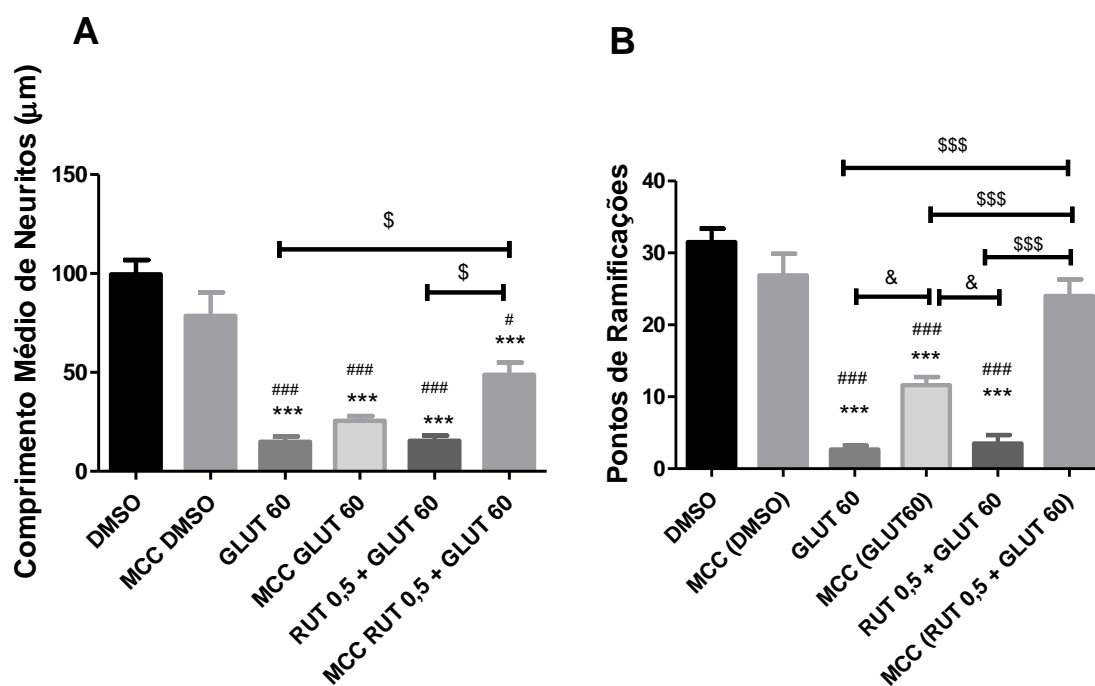


Figura 14: Análise do comprimento médio e número de pontos de ramificações de neuritos das células PC12 após o ensaio de neuroproteção direta e indireta durante 24h. Em A temos a comparação do comprimento médio de neuritos entre o tratamento direto e o tratamento indireto comparado aos controles. Em B está a comparação do número de pontos de ramificações que foram quantificados nos grupos que receberam o tratamento direto e o tratamento indireto comparado aos seus respectivos controles. A análise de variância foi realizada usando o One-way Anova e pós-teste Tukey's para múltipla comparação através do programa GraphPad Prism. *** $p < 0,0001$ representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle DMSO. # $p < 0,05$; ### $p < 0,0001$ representam diferenças estatísticas em relação às culturas em condições controle MCC (DMSO). & $p < 0,05$; representam diferenças estatísticas em relação às culturas MCC (GLUT 60); \$ $p < 0,05$; \$\$\$ $p < 0,0001$ representam diferenças estatísticas em relação em relação às culturas expostas a MCC RUT 0,5 + GLUT 60.

6.5 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA PELA RUTINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS/CÉLULAS GLIAIS MESENCEFÁLICAS

Visando melhor compreender os efeitos direto da rutina em uma cultura de células mais complexa que a cultura PC12 e entender como o flavonoide influencia na interação celular neurônio/glia e as suas possíveis alterações morfológicas, realizamos o tratamento da cultura primária de neurônios/células gliais mesencefálicas com a rutina a 0,5 µM durante 24 h. Foi possível visualizar um aumento de pontos de ramificações na cultura tratada com rutina quando

comparado ao grupo controle DMSO (0,001%). Ademais, houve também um aumento do comprimento dos neuritos na cultura que foi tratada com a rutina ao compararmos com o comprimento dos neuritos das células do tratamento controle que estavam visivelmente mais encurtados. Estes resultados sustentam a hipótese de que a rutina é capaz de exercer um efeito sob a morfologia de células em cultura, fenômeno também observado na cultura de células PC12 que recebeu o MCC GLUT 60 + RUT 0,5.

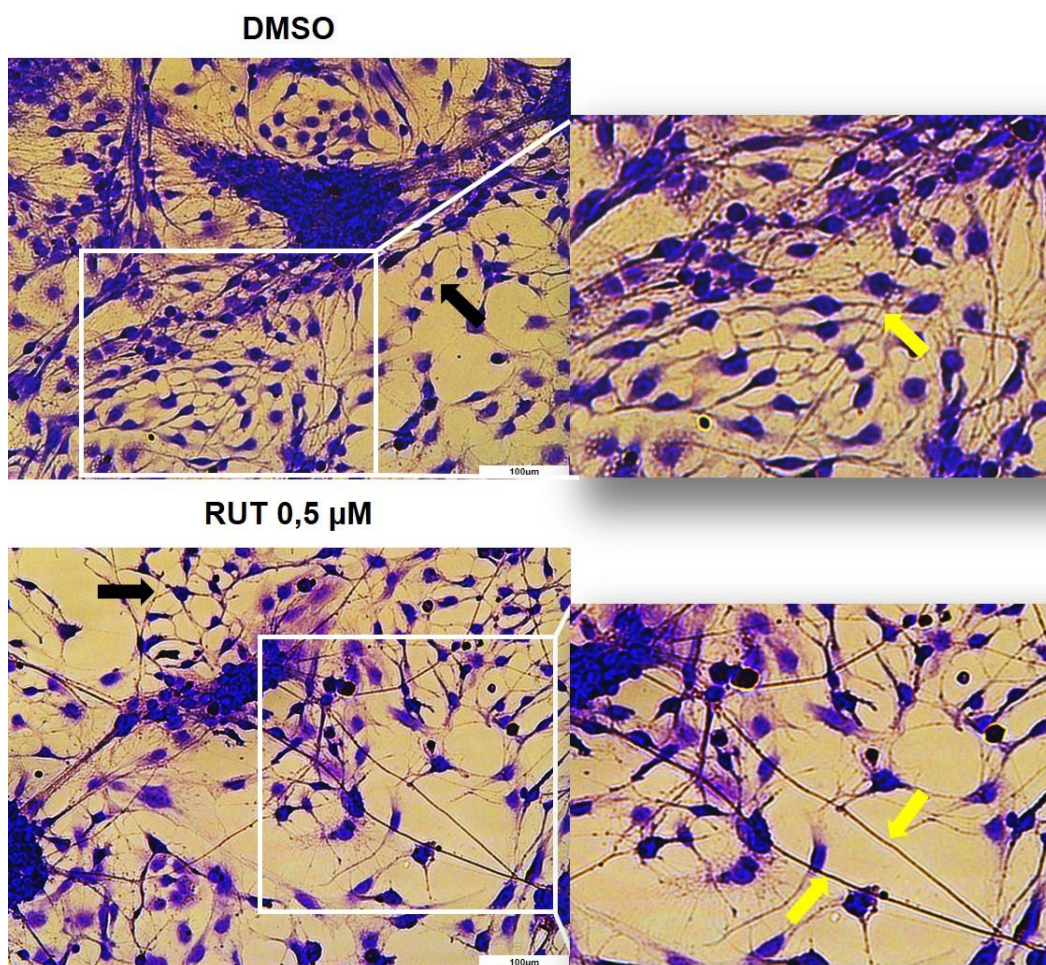


Figura 15 - Análise morfológica da cultura primária de neurônios/células glias mesencefálicas realizadas após coloração por Rosenfeld após 24h de tratamento com a rutina a 0,5 μM. DMSO: Cultura mesencefálica tratada com o veículo de diluição das substâncias, por 24h como controle (DMSO 0,005%). RUT 0,5 μM: Cultura mesencefálica exposta a rutina na concentração de 0,5 μM por 24 h. As setas pretas apontam as células que apresentam diferentes pontos de ramificações e que exercem conexões celulares. Em maior aumento e indicados com setas amarelas constam os neuritos com comprimentos variados e visivelmente aumentados no grupo tratado com RUT 0,5 μM. (Obj) de 20x.

7. DISCUSSÃO

A prospecção de metabólitos secundários vegetais, tem possibilitado identificar e orientar o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com potencial efeito antioxidante e neuroprotetor capaz de prevenir ou tratar doenças do SNC (GROSSO et al., 2013; DE ANDRADE-TELES et al., 2018). O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de investigar o potencial neuroprotetor do flavonoide rutina em um modelo *in vitro* da DP a partir da indução de lesão celular por excitotoxicidade do glutamato. Além disso, investigamos se o meio condicionado de cultura de cérebro tratados com glutamato e rutina apresenta ação menos tóxica para células PC12.

Células PC12 são células de linhagem com fenótipo neural, que podem ser diferenciadas em neurônios. Na literatura, a abordagem da rutina em células neuronais demonstra que este flavonoide interfere pouco na viabilidade celular. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com células de glioma da linhagem U251 (PITANGA *et al.*, 2012) e da linhagem GL-15 (SANTOS *et al.*, 2011) relataram que a rutina (50 μM e 100 μM) induziu baixa toxicidade celular, em ensaio baseado na técnica de exclusão ao azul de tripan. De acordo com os nossos resultados, o tratamento das células PC12 por 24h com o flavonoide rutina induziu baixa toxicidade nas menores concentrações testadas e apenas a concentração de 50 μM induziu diminuição da viabilidade celular estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. Sugerimos que a maior sensibilidade das células da linhagem PC12, quando comparado com os dados da literatura testados nas linhagens de glioma, por exemplo, seja justificada pela diferença na biologia destas células. As linhagens de células tumorais de glioblastomas são reconhecidas pela sua heterogeneidade e alterações genéticas que conferem mecanismos anti-apoptóticos (ERASIMUS et al., 2016). Além disso, estas células dispõem de uma proteção extra contra efeitos tóxicos proporcionada pelas células gliais (LI *et al.*, 2017) que apresentam diferentes aparatos para a detoxificação de xenobióticos (PITANGA *et al.*, 2012). Tudo isto torna as células de glioma resistentes a múltiplas drogas (HAAR *et al.*, 2012). Já os neurônios, apesar de apresentarem alguns aparatos enzimáticos como o sistema citocromo P450 (PITANGA *et al.*, 2012), dependem principalmente do metabolismo glial para a detoxificação de drogas.

A utilização de modelos para estudo da toxicidade neural induzido pelo excesso de glutamato, por sua vez, é extensivamente empregado em pesquisas experimentais envolvendo linhagens de células. Mais especificamente em células PC12, a influência do glutamato para a viabilidade celular é dependente da dose e do tempo (MA *et al.*, 2013). Chang (2014), demonstrou que a concentração de 15 mM e 10 mM é capaz de induzir morte após 24 h e 48 h

de tratamento com o glutamato respectivamente. Nossos resultados de citotoxicidade revelaram que o tratamento com o glutamato a partir da concentração a 10 mM durante 24h foi suficiente para interferir de forma significativa na viabilidade celular e que a toxicidade aumentava conforme a concentração do glutamato. Sugerimos então que os efeitos tóxicos exercidos pelo glutamato em células PC12 é também de maneira responsiva a dose. Uma vez que a morte neuronal pelo excesso de glutamato envolve o influxo de Ca^{2+} e é mediada pelos receptores NMDA, expressos em células PC12 (PENUGONDA *et al.*, 2006; POURZITAKI *et al.*, 2009), inferimos que a magnitude da excitotoxicidade pode ser dependente da expressão de receptores funcionais, do grau de ativação e da duração de ativação desses receptores (ZHOU *et al.*, 2013), que estão associados, por sua vez, a ativação parcial ou total de subunidades do receptor NMDA (BLANKE e VANDONGEN, 2009).

O efeito neuroprotetor da rutina contra a toxicidade glutamatérgica em células da linhagem PC12 ainda são desconhecidos. Rajabian (2018) e colaboradores foram os únicos, até o momento, que demonstraram o efeito neuroprotetor da rutina (100 mM) para as células PC12 contra a toxicidade do glutamato a 8 mM após 24 h de exposição. Nosso estudo demonstrou que a rutina é capaz de atenuar o dano induzido pelo glutamato para as células PC12 apenas na concentração a 10 mM. O que sugere um possível limiar de neuroproteção da rutina para células PC12 em condições de excitotoxicidade glutamatérgica. Propomos, então, que em situações de baixa concentração do glutamato, os mecanismos antioxidantes da rutina são suficientes para redução do conteúdo de EROs e diminuição da toxicidade para células PC12, concordando com dados publicados anteriormente (RAJABIAN *et al.*, 2018). A rutina é capaz de eliminar diretamente os EROs por possuir estrutura química que favorece esta ação (HANASAKI, OGAWA e FUKUI, 1994). Além disso, já foi relatado que a rutina aumenta a produção de enzimas antioxidantes, como a GSH a CAT e a SOD (AL-ENAZI, 2014), ao passo que inibe a xantina oxidase, enzima envolvida com a geração de EROs (KOSTIC *et al.*, 2015). Diante disto, cresce o otimismo pelo potencial terapêutico da rutina, o qual pode favorecer o tratamento de muitas doenças no qual o estresse oxidativo é uma das causas envolvidas na progressão (MAGALINGAM *et al.*, 2013; AL-ENAZI, 2014).

Em contrapartida, os nossos resultados demonstraram que em situações de alta concentração do glutamato (30 e 60 mM) a rutina não foi capaz de sustentar a neuroproteção. Neste sentido, sabe-se que este modelo de cultura de células não contempla as células gliais, as quais são essenciais para auxiliar na captação do glutamato. Logo, a ausência de astrócitos na cultura de célula PC12 pode ter implicado na ineficiência da rutina em regular a detoxificação do glutamato excedente. A neuroproteção da rutina para células PC12 em modelos de toxicidade

oxidativa, por outro lado, tem alcançado resultados satisfatórios, uma vez que não requerem, necessariamente, a ação intermediária de células gliais para auxiliar na neuroproteção. Magalingam (2016) reportou que o pré-tratamento das células PC12 com rutina é capaz de induzir neuroproteção via regulação de enzimas antioxidantes contra toxicidade da 6-OHDA a 100 μ M por 24 h, o que também está de acordo com estudos semelhantes (MAGALINGAM *et al.*, 2013; ELMAZOGLU *et al.*, 2017).

A ação da rutina em células gliais já é bem caracterizada pela comunidade científica (MAGALINGAM *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2018). Um recente estudo do grupo de pesquisa realizado por FERREIRA (2016), demonstrou que a rutina induziu ação neuroprotetora contra a toxicidade do glutamato a 60 mM a partir do aumento da expressão do GLAST, da manutenção da expressão da enzima GS e proteção mitoprotetora. Uma vez que não foi visualizado efeito direto neuroprotetor da rutina em células da linhagem PC12, passamos a investigar o efeito indireto utilizando meio condicionado de culturas organotípicas de cérebro de ratos Wistar.

A cultura organotípica de cérebro vem sendo amplamente utilizada na literatura como uma modelo *in vitro* bem estabelecido para entender as propriedades fisiológicas e patológicas de diversas células do SNS (GAHWILER *et al.*, 1997). Além disso, é capaz de preservar a organização estrutural e conectiva das células e manter o alto grau de diferenciação neuronal e glial (BAHR *et al.*, 1995; DAILEY *et al.*, 2013; GRABIEC *et al.*, 2017), o que permite um detalhamento crítico das respostas celulares mediante a exposições a fatores exógenos. Após realização do teste de viabilidade celular com o IP, nosso estudo demonstrou que o meio condicionado MCC tratado com rutina e/ou com a mais alta concentração de glutamato induziu baixa toxicidade para as células PC12. Portanto, nossa hipótese é que a rutina tenha promovido o aumento do metabolismo do glutamato durante a cultura organotípica de cérebro que pode ter refletido numa diminuição significativa da concentração de glutamato no meio condicionado e consequentemente uma menor exposição às células PC12. Em concordância aos nossos resultados, Zhang (2018) demonstrou recentemente a baixa toxicidade glutamatérgica para células neuronais na presença de astrócitos.

A emissão de neuritos é um evento importante para o restabelecimento dos circuitos neuronais funcionais e possível regeneração do SNC após dano celular (HIGGINS *et al.*, 2013). O papel dos fatores neurotróficos na indução de diferenciação neuronal, inclusive já é bem descrita na literatura (YOSHIDA *et al.*, 2016). Sagara (2004) e colaboradores demonstraram que a formação de prolongamentos citoplasmáticos em células da linhagem PC12 induzida pela rutina, está associada ao seu efeito neuroprotetor. Nossas análises morfológicas do tratamento

direto demonstraram que a rutina promoveu alterações celulares características de células em processo de diferenciação celular, representada por retração do corpo celular acompanhada de emissão de prolongamentos citoplasmáticos. No entanto, nos ensaios de neuroproteção envolvendo glutamato a 30 e 60 mM, a rutina não impediu a alteração morfológica das células PC12 para a morfologia ameboide, característica de dano por excesso de glutamato, nem induziu aumento do comprimento médio de neuritos e/ou aumento dos pontos de ramificações nas células. Além disso, foi notório o aumento de células esferoidais nos grupos que receberam glutamato a 30 mM quando comparado aos grupos que receberam 60 mM, o que nos permite acreditar que esta seria uma característica morfológica de células em processo de transição para as células ameboides e conseqüentemente de morte celular. Sugerimos, portanto, que a resistência das células PC12 ao excesso de glutamato, induzida pela rutina, está associada também a indução de alteração morfológica celular característica de neurodiferenciação.

Em contrapartida, o MCC foi capaz de manter características morfológicas habituais em parte da cultura de células PC12 além de induzir um aumento de células com emissão de prolongamentos, aumento do comprimento médio de neuritos e aumento dos pontos de ramificações nas células. Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (SOARES *et al.*, 2018), também observou mudanças morfológica em células PC12 associada a diferenciação celular após tratamento de células com meio condicionado de microglia. Uma vez que os diferentes fatores neurotróficos atuam como elementos chaves na neuroproteção associada a diferenciação neuronal (TOMÉ *et al.*, 2017), inferimos que a rutina foi capaz de regular positivamente a liberação de fatores neurotróficos, a exemplo do GDNF (SOARES *et al.*, 2018; YOSHIDA *et al.*, 2016) no meio condicionado cerebral do nosso estudo. Em adição, induções do aumento de pontos de ramificações e do comprimento de neuritos também foi observado em co-cultura mesencefálica neste estudo após tratamento com a rutina, confirmando mais uma vez que a rutina é de fato capaz de afetar a formação e crescimento de neuritos. Por tratar-se de uma cultura complexa no qual os neurônios podem exibir crescimento de axônios e dendritos e formar conexões sinápticas, esta torna-se uma cultura adequada para também para o estudo da morfologia celular (WEINERT *et al.*, 2015).

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a rutina não induz neuroproteção direta para células PC12 sob altas concentrações de glutamato. Por outro lado, o meio condicionado de cultura organotípica de cérebro tratados com rutina e glutamato induz baixa toxicidade para células PC12. Isto, associado aos dados descritos na literatura, sugere que a eficiência neuroprotora do flavonoide rutina contra a excitotoxicidade glutamatérgica possa estar associada à modulação do metabolismo do glutamato por astrócitos. Além disso, foi notório que mudanças morfológicas características de diferenciação neuronal estão associadas às células PC12 sob o efeito indireto da rutina e células de culturas primárias de mesencéfalo tratadas com rutina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELIOVICH A. e GITLER A. D. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. (2016) *Nature* 539, 207-216. 10.1038/nature20414.
- ABOTALEB, M.; SAMUEL, S.M.; VARGHESE, E.; VARGHESE, S.; KUBATKA, P.; LISKOVA, A.; BUSSELBERG, D. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. **Cancers** 2018, 11, 28.
- ALBIN RL, YOUNG AB, PENNY JB, HANDELIN B, BALFOUR R, ANDERSON KD, MARKEL DS, TOURTELLOTTE WW, REINER A. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. **N Engl J Med** 1990;322:1293e1298.
- AL-ENAZI M. M. Protective effects of combined therapy of rutin with silymarin on experimentally-induced diabetic neuropathy in rats. **Pharmacology & Pharmacy**. 2014;5(9):876–889.
- ALLEN NJ. Astrocyte regulation of synaptic behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2014;30(1):439–63.
- AMANI, N. SOODI M, DARAEI B, DASHTI A.. Chlorpyrifos Toxicity in Mouse Cultured Cerebellar Granule Neurons at Different Stages of Development: Additive Effect on Glutamate-Induced Excitotoxicity. **Cell J**, v. 18, n. 3, p. 464-72, Fall 2016. ISSN 2228-5806
- ANDERSON C.M., SWANSON R.A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**. :2000
- ARAQUE A, PARPURA V, SANZGIRI RP, HAYDON PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**. 1999;22(5):208–15.
- AUFSCHNAITER A, KOHLER V, DISSL J, PESELJ C, CARMONA-GUTIERREZ D, KELLER W, BÜTTNER S. Mitochondrial lipids in neurodegeneration. **Cell Tissue Res**. 2017 Jan;367(1):125-140.
- AYAZ M, SADIQ A, JUNAID M, ULLAH F, OVAIS M, ULLAH I, AHMED J, SHAHID M. Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders. **Front Aging Neurosci**. 2019 Jun 26;11:155.
- AZEVEDO FA, CARVALHO LR, GRINBERG LT, FARFEL JM, FERRETTI RE, LEITE RE, JACOB FILHO W, LENT R, HERCULANO-HOUZEL S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J Comp Neurol**. 2009 Apr 10;513(5):532-41.
- BAHR BA. Long-Term Hippocampal Slices: A Model System for Investigating Synaptic Mechanisms and Pathologic Processes. *J Neurosci Res*. 1995;42(3):294–305.
- BAK L.K., SCHOUSBOE A., WAAGEPETERSEN H.S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **J. Neurochem**. 2006;98:641–653.
- BERGLES DE, ROBERTS JD, SOMOGYI P, JAHR CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature** 405, (2000) 187–191.
- BERLIOCCI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 360, n. 1464, p. 2255-8, Dec 29 2005.
- BERMAN T and BAYATI A. What are Neurodegenerative Diseases and How Do They Affect the Brain?. **Front. Young Minds**. (2018). 6:70.
- BISHNOI M., CHOPRA K., KULKARNI S.K. Protective effect of rutin, a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. **Fundam. Clin. Pharmacol**. 2007;21(5):521–529.

BLANKE ML, VANDONGEN AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. **Chapter 13**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/>.

BRÖER S., BROOKES N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. **J. Neurochem.** 2001;77:705–719.

BROWN RH Jr, ROBBERECHT W: Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. **Semin Neurol** 2001; 21: 131–139.

BUNGAU S, ABDEL-DAIM MM, TIT DM, GHANEM E, SATO S, MARUYAMA-INOUE M, YAMANE S, KADONOSONO K. Health Benefits of Polyphenols and Carotenoids in Age-Related Eye Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Feb 12;2019:9783429. .

BUSCH C, BURKARD M, LEISCHNER C, LAUER UM, FRANK J, VENTURELLI S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics.* 2015 Jul 10;7:64.

CAI J, QI Y, HU X, TAN M, LIU Z, ZHANG J, LI Q, SANDER M, QIU M. Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron.* 2005 Jan 6; 45(1):41-53.

CANTER R. G., PENNEY J. and TSAI L.-H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. (2016). *Nature* 539, 187-196. 10.1038/nature20412.

CARRIEDO, S. G., YIN, H. Z., AND WEISS, J. H. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury *in vitro*. **J. Neurosci.** (1996). 16, 4069–4079.

CHAE, H., XU, R., WON, J., CHIN, Y., & YIM, H. Molecular Targets of Genistein and Its Related Flavonoids to Exert Anticancer Effects. (2019). *Int J Mol Sci.* 2019 May 16;20(10). pii: E2420.

CHAN, K. F., ZHAO, Y. Z., CHOW, T. W. S., YAN, C. S. W., MA, D. L., BURKETT, B. A., WONG IL, CHOW LM, CHAN TH. Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: structure-activity relationships. *Chemmedchem* (2009). 4, 594–614.

CHANG CH, CHEN HX, YÜ G, PENG CC, PENG RY. Curcumin-Protected PC12 Cells Against Glutamate-Induced Oxidative Toxicity. **Food Technol Biotechnol.** 2014;52(4):468–478.

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R., Prediction of *Dimorphandra mollis* bend (“faveiro”) seed longevity. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 557-564, 2003.

CHOI D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, (1988). 623–634. 10.1016/0896-6273(88)90162-6

CLABOUGH EB. Huntington’s disease: the past, present, and future search for disease modifiers. **Yale J Biol Med.** 2013;86:217–33.

CLARK, D. A. SENGUPTA P. ARAVINTHAN D. T. The AFD sensory neurons encode multiple functions underlying thermotactic behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**, v. 26, n. 28, p. 7444–51, Jul 12 2006.

COSTA SL, SILVA VD, DOS SANTOS SOUZA C, SANTOS CC, PARIS I, MUÑOZ P, SEGURA-AGUILAR J. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. **Neurotox Res**, v. 30, n. 1, p. 41-52, Jul 2016.

COUCH, J. F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C. F., Buckwheat as source of rutin. **Science**, Washington, v. 103, p. 197-198, 1946.

- COYLE JT, PUTTFARCKEN P: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science** 1993; 262: 689–695.
- CROSS JL, MELONI BP, BAKKER AJ, LEE S, KNUCKEY NW. Modes of Neuronal Calcium Entry and Homeostasis following Cerebral Ischemia. **Stroke Res Treat** (2010). 316862.
- CRUPI R, IMPELLIZZERI D, CUZZOCREA S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. **Front Mol Neurosci**. 2019;12:20. Published 2019 Feb 8.
- DAILEY ME, EYO U, FULLER L, HASS J, KURPIUS D,. Imaging microglia in brain slices and slice cultures. **Cold Spring Harbor**. Protoc. 2013;2013(12;1142-1148
- DAMIER, P., HIRSCH, E. C., AGID, Y. & GRAYBIEL, A. M. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain** (1999). 122, 1437–1448.
- DANBOLT., F. A. CHAUDHRY. DEHNESK. P. LEHREL. M. LEVYK. ULLENSVANG J. STORM-MATHISEN. Chapter 3: Properties and localization of glutamate transporters. **In: Progress in Brain Research** (1998) 116: 23-43.
- DAWSON, TM., DAWSON, VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. 819-822, 2003.
- DE ANDRADE TELES RB, DINIZ TC, COSTA PINTO TC, DE OLIVEIRA JÚNIOR RG, GAMA E SILVA M, DE LAVOR ÉM, FERNANDES AWC, DE OLIVEIRA AP, DE ALMEIDA RIBEIRO FPR, DA SILVA AAM, CAVALCANTE TCF, QUINTANS JÚNIOR LJ, DA SILVA ALMEIDA JRG. “Flavonoids as Therapeutic Agents in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Systematic Review of Preclinical Evidences,” **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2018, Article ID 7043213, 21 pages, 2018.
- DIAMOND, M., SCHEIBEL, A., AND ELSON, L. The Human Brain Coloring Book. **HaarperCollins**. (1985).
- DICKSON, D. W, BRAAK H, DUDA JE, DUYCKAERTS C, GASSER T, HALLIDAY GM, HARDY J, LEVERENZ JB, DEL TREDICI K, WSZOLEK ZK, LITVAN I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. **Lancet Neurol**. (2009). 8, 1150–1157.
- DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., AND TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol**. (1999). Rev. 51, 7–61.
- DIVITO, C. B.; UNDERHILL, S. M. Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. **Neurochem Int**, v. 73, p. 172-80, Jul 2014.
- DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 30, n. 4, p. 379-87, Apr 2009.
- DORSEY ER, CONSTANTINESCU R, THOMPSON JP, BIGLAN KM, HOLLOWAY RG, KIEBURTZ K, MARSHALL FJ, RAVINA BM, SCHIFITTO G, SIDEROWF A, TANNER CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**. 2007 Jan 30;68(5):384-6.
- DOS SANTOS C. C. Estudo do efeito neuroprotetor e imunomodulador de flavonoides em modelos *in vitro* da Doença de Parkinson. 2015. 74p. **Dissertação (Mestrado em Imunologia)**. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Ba. 2015.
- DRINGEN R, BRANDMANN M, HOHNHOLT MC, BLUMRICH EM. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. **Neurochem Res**, v. 40, n. 12, p. 2570-82, Dec 2015.

- ELMAZOGLU Z, ERGIN V, SAHIN E, KAYHAN H, KARASU C. Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response. **Interdiscip Toxicol.** 2017;10(4):129–141.
- ERASIMUS, H., GOBIN, M., NICLOU, S., VAN DYCK, E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research.** 2016 769, 19-35.
- ESCRIBANO-FERRER E, QUERALT REGUÉ J, GARCIA-SALA X, BOIX MONTAÑÉS A, LAMUELA-RAVENTOS RM. In Vivo Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone, and Quercetin in Mice. **J Nat Prod.** 2019 Feb 22;82(2):177-182.
- ESTRADA SÁNCHEZ, A. M., MEJÍA-TOIBER, J., & MASSIEU, L. Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. **Archives of Medical Research.** (2008). 39(3), 265–276.
- EULENBURG V, GOMEZA J Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. **Brain Res Rev.** 2010 May; 63(1-2):103-12.
- FARHADI F, KHAMENEH B, IRANSHAHI M, IRANSHAHY M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. **Phytother Res.** 2019 Jan;33(1):13-40.
- FEARNLEY, J. M. & LEES, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain** (1991). 114, 2283–2301.
- FERREIRA, R. S. Efeito neuroprotetor do flavonoide rutina em modelos de excitotoxicidade induzida por glutamato. 2016. 68p. **Dissertação** (Mestrado multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal da Bahia. Salvador, BA. 2016.
- FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. **Science**, v. 298, n. 5593, p. 556-62, Oct 18 2002. ISSN 0036-8075.
- FORAN E, TROTTI D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxid Redox Signal.** 2009;11(7):1587–1602.
- FREMEAU RT, VOGLMAIER S, SEAL RP, EDWARDS RH. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. **Trends Neurosci.** 2004a;27:98–103.
- GÄHWILER BH, CAPOGNA M, DEBANNE D, MCKINNEY RA, THOMPSON SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends Neurosci.** 1997 Oct;20(10):471-7. Review.
- GILGUN-SHERKI Y, ROSENBAUM Z, MELAMED E, OFFEN D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev.** 2002;54:271–84.
- GIRÁLDEZ-PÉREZ, R M, ANTOLÍN-VALLESPÍN M, MUÑOZ M, SÁNCHEZ-CAPELO A. Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica.** 2, 176, 2014.
- GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Chem Biol Interact**, v. 163, n. 1-2, p. 4-14, Oct 27 2006.
- GRABIEC U, HOHMANN T, HAMMER N, DEHGhani F. Organotypic Hippocampal Slice Cultures As a Model to Study Neuroprotection and Invasiveness of Tumor Cells. **J Vis Exp.** 2017;(126):55359. Published 2017 Aug 27.
- GREENE, L. A., AND TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci** (1976). USA 73, 2424–2428

GREENE , L. A. , LIU , D. X. , TROY , C. M. , AND BISWAS , S. C. Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease . **Biochim Biophys Acta**. (2006).

GRIFFITH, H. R, OKONKWO OC, O'BRIEN T, HOLLANDER JA. Reduced brain glutamate in patients with Parkinson's disease. **NMR Biomed**, v. 21, n. 4, p. 381-7, May 2008.

GROSSO, P. VALENTÃO, F. FERRERES, AND P. ANDRADE, “The use of flavonoids in central nervous system disorders,” **Current Medicinal Chemistry**, vol. 20, no. 37, pp. 4694–4719, 2013.

HAAR CP, HEBBAR P, WALLACE GC 4TH, DAS A, VANDERGRIFT WA 3RD, SMITH JA, GIGLIO P, PATEL SJ, RAY SK, BANIK NL. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. **Neurochem Res**. 2012;37(6):1192–1200.

HALLIDAY, G. M., HOLTON, J. L., REVESZ, T. & DICKSON, D. W. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. **Acta Neuropathol**. (2011). 122, 187–204.

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

HAO G, DONG Y, HUO R, WEN K, ZHANG Y, LIANG G. Rutin Inhibits Neuroinflammation and Provides Neuroprotection in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage, Possibly Through Suppressing the RAGE-NF- κ B Inflammatory Signaling Pathway. **Neurochem Res**. 2016 Jun;41(6):1496-504.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: advances in research since 1980. **New York: Chapman and Hall**, 1988

HARRIS, M. E, CARNEY JM, COLE PS, HENSLEY K, HOWARD BJ, MARTIN L, BUMMER P, WANG Y, PEDIGO NW JR, BUTTERFIELD DA. beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 6, n. 14, p. 1875-9, Oct 2 1995.

HE H, MAHNKE AH, DOYLE S, FAN N, WANG CC, HALL BJ, TANG YP, INGLIS FM, CHEN C, ERICKSON JD. Neurodevelopmental role for VGLUT2 in pyramidal neuron plasticity, dendritic refinement, and in spatial learning. **J. Neurosci**. 2012;32:15886–15901.

HEATH PR, SHAW PJ: Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle Nerve** 2002; 26: 438–458.

HEEMELS M.-T. Neurodegenerative diseases. *Nature*. (2016). 539, 179 10.1038/539179^a

HERCULANO-HOUZEL S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014;62:1377–1391.

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

HERTZ L., DRINGEN R., SCHOUSBOE A., ROBINSON S.R. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. **J. Neurosci**. Res. 1999;57:417–428.

HERZOG, E., BELLENCHI, G. C., GRAS, C., BERNARD, V., RAVASSARD, P., BEDET, C., GASNIER, B., GIROS, B., AND EL MESTIKAWY, S. (2001) **J. Neurosci**. 21, RC181

HIGGINS S, LEE JS, HA L, LIM JY. Inducing neurite outgrowth by mechanical cell stretch. **Biores Open Access** 2013;2(3): 212–216. pmid:23741633

- HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAK, M. B., Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry, Amsterdam**, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996
- HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. **Pharmacol.** 18, 925-964, 1966.
- HUSSAIN G, ZHANG L, RASUL A, ANWAR H, SOHAIL MU, RAZZAQ A, AZIZ N, SHABBIR A, ALI M, SUN T. Role of Plant-Derived Flavonoids and Their Mechanism in Attenuation of Alzheimer's and Parkinson's Diseases: An Update of Recent Data. **Molecules.** 2018 Apr 2;23(4). PII: E814.
- HYMAN, C. HOFER M, BARDE YA, JUHASZ M, YANCOPOULOS GD, SQUINTO SP, LINDSAY RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, v. 350, n. 6315, p. 230-2, Mar 21 1991.
- SOLANKI, I. P. PARIHAR, AND M. S. PARIHAR, "Neurodegenerative diseases: from available treatments to prospective herbal therapy," **Neurochemistry International**, vol. 95, pp. 100–108, 2016.
- INGELSSON, M., FUKUMOTO, H., NEWELL, K. L., GROWDON, J. H., HEDLEY-WHYTE, E. T., FROSCH, M. P., ALBERT MS, HYMAN BT, IRIZARRY MC. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. **Neurology.** (2004).62, 925–931.
- J. GORDON-BETTS, KELLY A. YOUNG, JAMES A. WISE, EDDIE JOHNSON, BRANDON POE, DEAN H. KRUSE, OKSANA KOROL, JODY E. JOHNSON, MARK WOMBLE, PETER DESAIX. Anatomy and Physiology. **OpenStax.** Houston, Texas. Apr 25, 2013. Disponível em: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/12-1-basic-structure-and-function-of-the-nervous-system>
- JAGMAG SA, TRIPATHI N, SHUKLA SD, MAITI S, KHURANA S. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Front Neurosci.** 2016;9:503. Published 2016 Jan 19.
- JÄKEL S, DIMOU L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. **Front Cell Neurosci.** 2017 Feb 13;11:24.
- JOACHIM C. L., SELKOE D. J. The seminal role of β -amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders.** 1992;6(1):7–34.
- KALIA LV, LANG AE. Parkinson's disease. **Lancet.** 2015 Aug 29;386(9996):896-912.
- KHAKH BS, DENEEN B. The Emerging Nature of **Astrocyte** Diversity. **Annu Rev Neurosci.** 2019 Jul 8;42:187-207.
- KHAKH BS, SOFRONIEW MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nat Neurosci.** 2015 Jul;18(7):942-52.
- KHAN H, PERVIZ S, SUREDA A, NABAVI SM, TEJADA S. Current standing of plant derived flavonoids as an antidepressant. **Food Chem Toxicol.** 2018 Sep;119:176-188
- KHAN M.M., AHMAD A., ISHRAT T., KHUWAJA G., SRIVASTAWA P., KHAN M.B., RAZA S.S., JAVED H., VAIBHAV K., KHAN A., ISLAM F. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain Res.** 2009;1292:123–135.
- KHAN MM, RAZA SS, JAVED H, AHMAD A, KHAN A, ISLAM F, SAFHI MM, ISLAM F. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotox Res.** 2012 Jul;22(1):1-15
- KRITIS, A. A. STAMOULA EG, PANISKAKI KA, VAVILIS TD.. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 91, 2015. ISSN 1662-5102.

KROLS M, VAN ISTERDAEL G, ASSELBERGH B, KREMER A, LIPPENS S, TIMMERMAN V, JANSSENS S. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. **Acta Neuropathol.** 2016 Apr;131(4):505-23.

KULA B, CHEN TJ, Kukley M. Glutamatergic signaling between neurons and oligodendrocyte lineage cells: Is it synaptic or non-synaptic? *Glia.* 2019 Apr 5.

KOSTIĆ, D. S. Dimitrijević, G. S. Stojanović, I. R. Palić, A. S. Đorđević, and J. D. Ickovski, "Xanthine oxidase: isolation, assays of activity, and inhibition," *Journal of Chemistry*, vol. 2015, Article ID 294858, 8 pages, 2015.

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

LEHRE KP, DANBOLT NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. **J Neurosci.** 1998 Nov 1; 18(21):8751-7.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios conceitos fundamentais de neurociências. Editora Atheneu; Edição: 2 (5 de fevereiro de 2010).

LI G., QIN Z., CHEN Z., XIE L., WANG R., ZHAO H. Tumor microenvironment in treatment of glioma. *Open Med. (Wars)* 2017;12:247–251.

LIGUZ-LECZNA M, SKANGIEL-KRAMSKA J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(3):207-18.

LIN SC, BERGLES DE. Synaptic signaling between neurons and glia. **Glia.** (2004a). 47, 290–298.

FERREYRA, M. L. F. S. P. RIUS, E P. CASATI, "Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications," **Frontiers in Plant Science**, vol. 3, p. 222, 2012.

MA K, YANG LM, CHEN HZ, LU Y. Activation of muscarinic receptors inhibits glutamate-induced GSK-3 β overactivation in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 34, 886–892 (2013) doi:10.1038/aps.2013.42

MACHADO D.G., BETTIO L.E., CUNHA M.P., SANTOS A.R., PIZZOLATTI M.G., BRIGHENTE I.M., RODRIGUES A.L. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur. J. Pharmacol.** 2008;587(1–3):163–168.

MACHADO, A. B. Neuroanatomia funcional. [S.I]: **Atheneu**, 2005.

MACHADO, ANGELO B.M.; HAERTEL, LÚCIA MACHADO. **Neuroanatomia funcional.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

MAGALINGAM KB, RADHAKRISHNAN A, HALEAGRAHARA N. Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6- OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. **BMC Res Notes** 2014; 7: 49.

MAGALINGAM KB, RADHAKRISHNAN A, HALEAGRAHARA N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercitrin against 6- hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2016; 29(1): 30-9.

- MAGALINGAM KB, 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** (2013). 32:235–240
- MAHMOUD AM, HERNÁNDEZ BAUTISTA RJ, SANDHU MA, HUSSEIN OE. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Mar 10;2019:5484138.
- MALAGELADA, C., e GREENE, L. A. PC12 Cells as a model for parkinson's disease research. **Parkinson's Disease**, (2008). 375–387.
- MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 2004;79:727–47.
- MARTINEZ-HERNANDEZ A, BELL KP, NORENBURG MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 1977 Mar 25;195(4284):1356-8.
- MOHAMMAD TAGHI JOGHATAEI, FERESHTEH AZEDI AND SORAYA MEHRABI (May 24th 2019). Reactive Astrocyte Gliosis: Production of Inhibitory Molecules, Spinal Cord Injury Therapy, Antonio Ibarra, Elisa García-Vences and Gabriel Guízar-Sahagún, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.85570. Available from: <https://www.intechopen.com/books/spinal-cord-injury-therapy/reactive-astrocyte-gliosis-production-of-inhibitory-molecules>
- MATHISEN J, SEEBERG E, KANNER BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature**. 1992 Dec 3; 360(6403):464-7.
- MAYCOX, P. R., HELL, J. W., AND JAHN, R. **Trends Neurosci**. (1990) 13, 83–87
- NAM JS, SHARMA AR, NGUYEN LT, CHAKRABORTY C, SHARMA G, LEE SS. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. **Molecules** 21, E108 (2016).
- NETO, J. G. V. FALAVIGNA, A. Neuroanatomia. Tomo II. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2003. 183 p.
- NICHOLLS DG. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1147:53-60.
- NIEOCZYM D., SOCAŁA K., RASZEWSKI G., WLAŻ P. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol*. **Biol. Psychiatry**. 2014;54:50–58.
- NIQUET J, SEO DW, WASTERLAIN CG. Mitochondrial pathways of neuronal necrosis. **Biochem Soc Trans**. 2006;34:1347–1351.
- NISHIYAMA A, SUZUKI R, ZHU X. NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair. **Front Neurosci**. 2014;8:133. Published 2014 Jun 27.
- NUNNARI J, SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**. 2012;148:1145–1159.
- ORTOLANI O., CAGGIANO M., MANNELLI R., GOGLIETTINO A., Tufano R. Protection from ischemia-reperfusion damage in patients with stroke: the role of rutin and GSH. **Transplant. Proc**. 1995;27(5):2877–2878.
- OSTRAKHOVITCH E.A., AFANAS'EV I.B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. **Biochem. Pharmacol**. 2001;62(6):743–746.
- PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: An overview. **J. Nutr. Sci**. 2016, 5, e47.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat brain: in Stereotaxic Coordinates. **Elsevier**, 6. ed., 2007.
- PEMBERTON K, MERSMAN B, XU F. Using ImageJ to Assess Neurite Outgrowth in Mammalian Cell Cultures: Research Data Quantification Exercises in Undergraduate Neuroscience Lab. **J Undergrad Neurosci Educ**. 2018;16(2):A186–A194. Published 2018 Jun 15.
- PENUGONDA, S., MARE, S., LUTZ, P., BANKS, W. A., AND ERCAL, N. Potentiation of lead-induced cell death in PC12 cells by glutamate: protection by Nacetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** (2006). 216, 197–205.
- PEREIRA, E. P. L., BRAGA-DE-SOUZA, S., SANTOS, C. C., SANTOS, L. O., CERQUEIRA, M. D., RIBEIRO, P. R., COSTA, S. L. Amburana cearensis seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, (2017). 27(2), 199–205.
- PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 423-36, Jun 2008.
- PITANGA, B. P. S. Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma (2012). 103 f. Tese (Doutorado em Imunologia). Programa de pós-graduação em Imunologia. Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia.
- PLAITAKIS A, CAROSCIO JT. Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**. 1987; 22: 575-579.
- POURZITAKI, C & KANELLOS, G & KLAGAS, I & KRITIS, ARISTEIDIS. Combined treatment of aspartyl protease inhibitor and Nmda antagonist in Pc12 cells after glutamate excitotoxicity. **Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics**, International Edition. (2008). 22. 304-307.
- POURZITAKI, C., KLAGAS, I., KANELLOS, G., AND KRITIS, A. Calpain mediated cell death in naive and NGF treated PC12 cells after glutamate induced exitotoxicity. **Epilepsia. Klin. Farmakol. Farmakokinet.** (2009). 27, 79–82.
- PRENTICE HOWARD, JIGAR PRAVINCHANDRA MODI, AND JANG-YEN WU, “Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases,” **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2015, Article ID 964518, 7 pages.
- PROCACCINI, C., SANTOPAULO, M., FAICCHIA, D., COLAMATTEO, A., FORMISANO, L., de CANDIA, P., GALGANI, M., De ROSA, V. and MATARESE, G. (2016) 'Role of metabolism in neurodegenerative disorders', *Metabolism*, 65(9), pp. 1376-90.
- RAJABIAN A, SADEGHNIA H, MORADZADEH M, HOSSEINI A. Rheum turkestanicum reduces glutamate toxicity in PC12 and N2a cell lines. **Folia Neuropathologica**. 2018;56(4):354-361.
- REINER, A., LEVITZ, J. Review Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System : Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**. 2018. 98, 1080–1098.
- RODRIGUEZ, M. C.; OBESO, J. A.; OLANOW, C. W. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S175-88, Sep 1998.
- ROMANO B, PAGANO E, MONTANARO V, FORTUNATO AL, MILIC N, BORRELLI F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytother. Res**. 27, 1588–1596 (2013).
- ROSE C.R., ZIEMENS D., UNTIET V., FAHLKE C. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. **Brain Res. Bull**. 2018

ROSENBLUM LT, TROTTI D. EAAT2 and the Molecular Signature of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Adv Neurobiol.** 2017;16:117–136.

ROTHSTEIN JD, VAN KAMMEN M, LEVEY AI, MARTIN LJ, KUNCL RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* (1995) 38: 73-84.

RUKENSTEIN , A. , RYDEL , R. E. , AND GREENE , L. A Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms . **J Neurosci.** (1991). 11 , 2552– 2563 .

RYLSKI M., DURIASZ-ROWIŃSKA H., REWERSKI W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. **Acta Physiol. Pol.** 1979;30(3):385–388.

SAGARA, Y. VANHNASY, J. AND MAHER, P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. **Journal of Neurochemistry**, (2004), 90: 1144-1155.

SANTOS, B. L., SILVA, A. R., PITANGA, B. P. S., SOUSA, C. S., GRANGEIRO, M. S., FRAGOMENI, B. O., ... COSTA, S. L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, (2011). 127(2), 404–411. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.131.

SATTLER R, CHARLTON MP, HAFNER M, TYMIANSKI M Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. **J Neurochem** (1998). 71:2349–2364.

SCIMEMLI, A. The Role of Astrocytes in Neurotransmitter Uptake and Brain Metabolism. **Computational Glioscience**, (2019). 309–328.

SCOTT HA, GEBHARDT FM, MITROVIC AD, VANDENBERG RJ, DODD PR. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(3):553 e551–511.

SEAL RP, AKIL O, YI E, WEBER CM, GRANT L, YOO J, CLAUSE A, KANDLER K, NOEBELS JL, GLOWATZKI E, LUSTIG LR, EDWARDS RH. Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. **Neuron.** 2008;57:263–275.

SELVARAJ G., KALIAMURTHI S., THIRUNGNASAMBANDAM R., VIVEKANANDAN L., BALASUBRAMANIAN T. Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. **Biomed. Environ. Sci.** 2014;27(4):295–299.

SHARPEE TO. Toward functional classification of neuronal types. *Neuron.* 2014 Sep 17;83(6):1329-34.

SILVA AR, PINHEIRO AM, SOUZA CS, FREITAS SR, VASCONCELLOS V, FREIRE SM, VELOZO ES, TARDY M, EL-BACHÁ RS, COSTA MF, COSTA SL. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p. 75–86, 2008.

SIMONS M, NAVE KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jun 22;8(1):a020479.

SIMPSON JE, INCE PG, LACE G, FORSTER G, SHAW PJ, MATTHEWS F, SAVVA G, BRAYNE C, WHARTON SB. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiology of Aging.** 2010;31(4):578–590.

- SMEAR MC, TAO HW, STAUB W, ORGER MB, GOSSE NJ, LIU Y, TAKAHASHI K, POO MM, BAIER H. Vesicular glutamate transport at a central synapse limits the acuity of visual perception in zebrafish. **Neuron**. 2007;53:65–77.
- SOARES, E. N. Citologia de células neurais da linhagem pc12 sob efeito de meio condicionado de microglia modulada por lps e rutina. 2018. 56p. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Ba. 2018.
- SOFRONIEW M.V., VINTERS H.V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathol**. 2010;119:7–35.
- SPARGO E, EVERALL IP AND LANTOS PL. Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 1993;56:487–491.
- SPENCER JPE. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. **Genes Nutr** 2007;2:257–73.
- SPENCER, J. P., VAFEIADOU, K., WILLIAMS, R. J. AND VAUZOUR, D. 'Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action', **Mol Aspects Med**, (2012) 33(1), pp. 83-97.
- STOPPINI, L.; BUCHS, P. A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods**, v. 37, n. 2, p. 173-82, Apr 1991.
- STORCK T, SCHULTE S, HOFMANN K, STOFFEL W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1992 Nov 15; 89(22):10955-9.
- SWANSON GT, SAKAI R. Ligands for ionotropic glutamate receptors. *Prog Mol Subcell Biol*. 2009;46:123-57.
- TAYLOR J. P., BROWN R. H. Jr and CLEVELAND D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. (2016). *Nature* 539, 197-206. 10.1038/nature20413
- THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M., Position of the American Dietetic Association, **Orlando**, v. 99, n. 10, p. 1280-1281, 1999.
- TOMÉ, D., FONSECA, C.P., CAMPOS, F.L., BALTAZAR, G. Role of neurotrophic factors in Parkinson's disease. **Curr. Pharm. Des.** 23, 809-838, 2017.
- VANDENBERG RJ, RYAN RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*. 2013 Oct;93(4):1621-57.
- VELASCO M, ROJAS-QUINTERO J, CHÁVEZ-CASTILLO M, ROJAS M, BAUTISTA J, MARTINEZ M S, SALAZAR J, MENDONZA R, BERMÚDEZ V. Excitotoxicity: An Organized Crime at The Cellular Level. **J Neurol Neurosci**. (2017). Vol. 8 No. 3: 193.
- VENTURA R, HARRIS KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. **J Neurosci**. 1999;19(16):6897–906.
- VONSATTEL JP AND DIFIGLIA M. Huntington disease. **J Neuropathol Exp Neurol**. 1998;57:369–384.
- WANG R, REDDY PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**. 2017;57(4):1041–1048.
- WANIEWSKI R.A., MARTIN D.L. Exogenous glutamate is metabolized to glutamine and exported by rat primary astrocyte cultures. **J. Neurochem**. 1986;47:304–313.

- WEINERT M, SELVAKUMAR T, TIERNEY TS, ALAVIAN KN. Isolation, culture and long-term maintenance of primary mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rodent brains. *J Vis Exp*. 2015;(96):52475. Published 2015 Feb 19.
- WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv Neurol*, 1993. v. 60, p. 53-61.
- WILLIAMS, R. J. AND SPENCER, J. P. 'Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease', *Free Radic Biol Med*, (2012) 52(1), pp. 35-45
- WOLF SA, BODDEKE HW, KETTENMANN H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:619-643.
- WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. (2016).*Nature* 539, 180-186. 10.1038/nature20411
- XIAO J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Jun 13;57(9):1874-1905.
- XU PX, WANG SW, YU XL, SU YJ, WANG T, ZHOU WW, ZHANG H, WANG YJ, LIU RT. Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A β oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*. 2014;264:173–180.
- YOSHIDA SHINICHIRO, NAOHIDE YAMAMOTO, NAOHISA WADA³, ATSUSHI TOMOKIYO, DAIGAKU HASEGAWA, SAYURI HAMANO, HIROMI MITARAI, SATOSHI MONNOUCHI, ASUKA YUDA AND HIDEFUMI MAEDA. GDNF from human periodontal ligament cells treated with proinflammatory cytokines promotes neurocytic differentiation of PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. v118, pp 699-708 2016.
- YOU DIM KA, QAISER MZ, BEGLEY DJ, RICE-EVANS CA, ABBOTT NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2004;36:592–604.
- YOUNG AB, GREENAMYRE JT, HOLLINGSWORTH Z, ALBIN R, D'AMATO C, SHOULSON I, PENNEY JB. NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 1988;24:981e983. 29.
- YUAN J, YANKNER BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407:802–9.
- ZAKARYAN H, ARABYAN E, OO A, ZANDI K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch Virol*. 2017 Sep;162(9):2539-2551.
- ZHANG, L., WANG, Q., XIAN, X., QI, J., LIU, L., & LI, W. Astrocytes enhance the tolerance of rat cortical neurons to glutamate excitotoxicity. *Molecular Medicine Reports*. (2018).
- ZHANG, W., DALLAS, S., ZHANG, D., GUO, J.P., PANG, H., WILSON, B., MILLER, D.S., CHEN, B., MCGEER, P.L., HONG, J.S., ZHANG, J. Microglial PHOX and Mac-1 are essential to the enhanced dopaminergic neurodegeneration elicited by A30P and A53T mutant alpha-synuclein. *Glia* 200755 (11), 1178–1188
- ZHOU Y, DANBOLT NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):799-817.
- ZHU X, BERGLES DE, NISHIYAMA A. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development*. 2008 Jan; 135(1):145-57.
- ZIBADI S, PREEDY VR, WATSON RR. Polyphenols in human health and disease. **London: Academic Press; 2014.**