

NEUROPROTEÇÃO E AÇÃO ANTIOXIDANTE EM MICROGLIÓCITOS: O  
PAPEL DO DERMATAM SULFATO EXTRAÍDO DE *Phallusia nigra*.

DIOVANA RAMOS GERIN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2023

NEUROPROTEÇÃO E AÇÃO ANTIOXIDANTE EM MICROGLIÓCITOS: O PAPEL DO  
DERMATAM SULFATO EXTRAÍDO DE *Phallusia nigra*.

DIOVANA RAMOS GERIN

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cintia Monteiro de Barros

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ - FEVEREIRO 2023

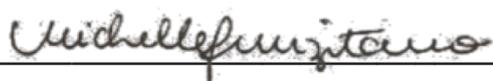
NEUROPROTEÇÃO E AÇÃO ANTIOXIDANTE EM MICROGLIÓCITOS: O  
PAPEL DO DERMATAM SULFATO EXTRAÍDO DE *Phallusia nigra*.

DIOVANA RAMOS GERIN

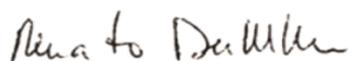
“Dissertação apresentada ao Centro de  
Biodiversidade e Biotecnologia, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia.”

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.

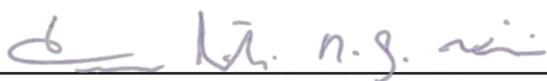
Comissão Examinadora:



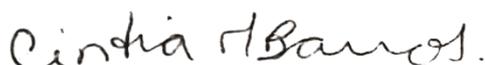
Prof. Michelle Frazão Muzitano (D.Sc., Química de Produtos Naturais) – UFRJ



Prof. Renato Augusto DaMatta (D.Sc., Ciências Biológicas) – UENF



Prof. Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira (D.Sc., Química Biológica) – UFRJ



Prof. Cintia Monteiro de Barros (D.Sc., Ciências Morfológicas) – UFRJ (Orientadora)

# FICHA CATALOGRÁFICA

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

G369

Gerin, Diovana Ramos.

Neuroproteção e ação antioxidante em microglíocitos : o papel do dermatam sulfato extraído de *Phallusia nigra*. / Diovana Ramos Gerin. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

98 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Cintia Monteiro de Barros.

1. Glicosaminoglicano. 2. Doença neurodegenerativa. 3. Paraquat. 4. Heparina. 5. Dexametasona. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

*“Sic itur ad astra”*

Assim é que se chega aos astros.

Virgílio, Eneida. Livro IX, verso 641 Eneida (29–19 a.C.)

*“Ad astra, to the stars”*

Mensagem de boa sorte dita por astronautas antes da decolagem.

Dedico essa conquista à minha mãe (*in memoriam*), Professora Ariete, de quem eu herdei não só os cachinhos e os olhos castanhos, mas também a inquietação em questionar o mundo e ser rebelde. Quem me tornou cientista desde pequena.

## AGRADECIMENTOS

Ao universo, que por muitos momentos eu achei que estava conspirando para eu não concluir esse mestrado. Mas agora eu compreendo que todos os eventos, sejam eles bons ou ruins, me trouxeram para esse momento no aqui e agora, e esse é o melhor lugar que essa Diovana poderia conhecer.

Todo o meu esforço sozinho não seria o suficiente para finalizar esse trabalho, contei com o apoio de muitos e a eles devo o meu agradecimento:

- Ao meu marido Carlos Alberto, além de agradecer todos os dias por ter a sorte de ter um ser humano como você ao meu lado, agradeço por ter sido o meu financiador, revisor, designer, motorista, terapeuta, cozinheiro e companheiro. Obrigada por toda a paciência que você teve comigo quando os experimentos não funcionavam e nos momentos que eu queria jogar tudo para o alto quando a ansiedade batia. Mas também por estar ao meu lado nas pequenas conquistas, por se alegrar comigo e não poupar palavras para me dizer o quanto se orgulha de mim. Um capítulo na minha e, conseqüentemente, nas nossas vidas está se encerrado e sei que você continuará me apoiando nas minhas próximas escolhas.
- À minha orientadora Cintia, que fez seu trabalho com excelência. Me guiou durante todo esse mestrado, me ensinando e me apoiando. Admiro sua história e todas as suas conquistas, tanto profissionais como pessoais. Mesmo sendo diretora, professora, pesquisadora, mãe e orientadora de tantos alunos, você ainda pensa em cada um e em suas singularidades. Muito obrigada por me ver como uma. Quero ser que nem você quando eu crescer.
- Aos meus colegas de trabalho, que viraram os meus melhores amigos:
- Taiane, para ela um único parágrafo não seria o suficiente. A sala de cultura se tornou o nosso cantinho de fofoca, risada e choro. Parece que a gente sempre se conheceu, pois dividimos o mesmo neurônio. Você sempre esteve do meu lado, e como foi bom ter você para ter para onde correr quando as coisas não funcionavam. Esse trabalho só foi possível por causa da sua parceria. O que a sala de cultura uniu ninguém separa.
- Grazi, a rainha da cultura de células. Mãe científica de mim e da Taiane. Obrigada por trazer essa luz, sabedoria e colo, para nós.
- Thuany, a rainha dos antioxidantes. Obrigada por ter sido tão prestativa em me ajudar nos experimentos e nas análises estatísticas. Sou grata por isso ter nos aproximado.

- Nathany, minha amiga desde a graduação e quem me trouxe para esse grupo de pesquisa maravilhoso. Fico tão orgulhosa de crescer junto com você. Tenho certeza de que ainda vamos alcançar muito mais.
- Taynan, o bendito é o fruto entre as mulheres. Admiro demais a sua inteligência e sua maturidade. Se uma pessoa nasceu para a pesquisa, essa pessoa é você.
- Amanda, a minha amiga Barbie cientista. Obrigada, me ensinar sobre garra e determinação. Te admiro muito!!
- Ao Marlon, que exemplo de ser humano elevado. Mesmo sendo de outro laboratório sempre esteve disponível a me ajudar nos experimentos e agora é até meu professor de yoga.
- A todos os outros amigos e companheiros de laboratório, muito obrigada a cada um de vocês, todos me enriqueceram como pesquisadora e pessoa.
- Aos meus filhos de quatro patas (preparem-se, pois, a lista é grande) por me darem amor incondicional: Dexter, Miúdo, Morango, Pudim, Pérola (Neném), Luna (Peluda), Misty (Preta), Cheddar e Catita. E todos os meus outros anjinhos que já se foram.
- À minha vó Nete, que mesmo tão humilde sempre reconheceu a importância do estudo. Se orgulhou da filha que teve e hoje deve se orgulhar da neta. Obrigada por me dar forças para me dedicar.
- Aos revisores, Professor Leonardo e Professora Sheila, por dedicarem o seu tempo para melhorar o meu trabalho.
- À banca examinadora, Professora Michelle, Professora Tuane e Professor Renato, que gentilmente aceitou o convite de participar da defesa deste trabalho
- À UENF, UFRJ-Macaé, Faperj e CAPES pela estrutura e concessão de bolsa.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT .....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
<b>1.1. Neurodegeneração</b> .....	1
<b>1.1.1. Estresse oxidativo</b> .....	2
1.1.1.1. Geração das espécies reativas de oxigênio .....	2
1.1.1.2. Mecanismos antioxidantes .....	3
1.1.1.3. Desbalanço de ROS na neurodegeneração .....	5
<b>1.1.2. Microglíocitos: estresse oxidativo e neurodegeneração</b> .....	5
<b>1.1.3. Pesticida como estressor oxidativo</b> .....	7
1.1.3.1. Ação do paraquat no sistema nervoso .....	9
1.1.3.2. Modelo de cultura celular .....	12
<b>1.2. Estratégias de neuroproteção</b> .....	14
<b>1.2.1. Glicosaminoglicanos</b> .....	16
1.2.1.1. GAGs no sistema nervoso .....	18
1.2.1.2. Ação antioxidante dos GAGs .....	19
1.2.1.3. O Dermatam Sulfato .....	20
1.2.1.4. O DS de animais marinhos .....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVO.....	26
<b>3.1. Geral</b> .....	26
<b>3.2. Específicos</b> .....	26
4. METODOLOGIA.....	27
<b>4.1. Obtenção das ascídias</b> .....	27
<b>4.2. Extração e purificação do dermatam sulfato de <i>Phallusia nigra</i></b> .....	27
<b>4.2.1. Extração de <i>PnDS</i></b> .....	27
<b>4.2.2. Purificação de <i>PnDS</i></b> .....	28
<b>4.2.3. Confirmação do isolamento e caracterização do <i>PnDS</i></b> .....	30
<b>4.3. Manutenção da linhagem celular de microglíocitos BV-2</b> .....	32
<b>4.4. Desenho experimental</b> .....	32
<b>4.5. Ensaio de atividade mitocondrial por MTT</b> .....	33

4.6.	<b>Análise morfológica celular por microscopia de contraste de fase</b> .....	34
4.7.	<b>Quantificação de ROS por citofluorescência</b> .....	35
4.8.	<b>Análise do sistema antioxidante celular</b> .....	37
4.8.1.	Determinação da atividade da superóxido dismutase .....	37
4.8.2.	Determinação da atividade da catalase .....	37
4.8.3.	Avaliação do dano celular pela peroxidação lipídica .....	38
4.9.	<b>Método de Bradford para a quantificação de proteínas totais</b> .....	39
4.10.	<b>Análise Estatística</b> .....	39
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	40
5.1.	<b>Diminuição da atividade mitocondrial pelo PQ em microgliócitos BV-2</b> .....	40
5.2.	<b>Mudanças morfológicas em microgliócitos BV-2 ocasionadas por diferentes concentrações de PQ</b> .....	41
5.3.	<b>Diminuição da produção de ROS pelo <i>PnDS</i> co-incubado com PQ</b> .....	43
5.4.	<b>Restauração da atividade mitocondrial pelo <i>PnDS</i> co-incubado com PQ em BV-2</b> 48	
5.5.	<b>Modulação da atividade do sistema antioxidante celular pelo <i>PnDS</i> co-incubado com PQ em BV-2</b> .....	49
5.6.	<b>Diminuição da peroxidação lipídica no grupo <i>PnDS</i> co-incubado com o PQ em BV-2</b> .....	51
5.7.	<b>Mudanças morfológicas e restauração da morfologia homeostática microglial promovida pelo <i>PnDS</i> co-incubado com o PQ em BV-2</b> .....	52
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Geração mitocondrial de ROS.....	4
<b>Figura 02:</b> Sistemas de eliminação de ROS nas mitocôndrias.....	4
<b>Figura 03:</b> Esquema de estados e função da polarização microglial.....	7
<b>Figura 04:</b> Estrutura química do Paraquat.....	8
<b>Figura 05:</b> Mecanismo de ação do PQ nos neurônios dopaminérgicos do SNC de mamíferos.....	10
<b>Figura 06:</b> Balanço entre a progressão do estresse oxidativo gerado pelo PQ em BV-2 e a sua regressão gerada por NAC.....	11
<b>Figura 07:</b> Células BV-2 em cultura.....	13
<b>Figura 08:</b> Potenciais alvos que um “agente terapêutico ideal da DA” pode modular para reduzir a progressão da patologia da DA.....	16
<b>Figura 09:</b> Componentes da matriz extracelular (MEC) do SN.....	18
<b>Figura 10:</b> Mecanismo proposto para a ação antioxidante e neuroprotetora do CS.....	20
<b>Figura 11:</b> Ascídia <i>Phallusia nigra</i> .....	22
<b>Figura 12:</b> Principais unidades dissacarídicas repetitivas de dermatam sulfatos de ascídia e mamífero.....	23
<b>Figura 13:</b> Isolamento e caracterização de polissacarídeos totais de <i>P. nigra</i> antes e após a incubação com condroitinase AC ou ABC.....	31
<b>Figura 14:</b> Tipos morfológicos microgliais avaliados.....	35
<b>Figura 15:</b> Formação do composto fluorescente DCF por ROS.....	36
<b>Figura 16:</b> Atividade mitocondrial em células BV-2 tratadas com diferentes concentrações de PQ.....	40
<b>Figura 17:</b> Morfologia de células BV-2 tratadas por diferentes concentrações de PQ.....	42
<b>Figura 18:</b> Produção de ROS intracelular em células BV-2 tratadas com diferentes concentrações de DEX, HM e PnDS.....	44
<b>Figura 19:</b> Produção de ROS intracelular em células BV-2 tratadas com diferentes concentrações de dex, HM e PnDS co-incubados com PQ.....	45
<b>Figura 20:</b> Quantificação por citofluorescência H2DCFDA da produção de ROS intracelular nas células BV-2.....	47
<b>Figura 21:</b> Atividade mitocondrial em células BV-2 com os diferentes tratamentos e co-incubadas com PQ.....	48
<b>Figura 22:</b> Atividade enzimática antioxidante nos diferentes tratamentos em BV-2.....	50
<b>Figura 23:</b> Peroxidação lipídica nos diferentes tratamentos celulares.....	51
<b>Figura 24:</b> Avaliação da morfologia celular dos grupos com diferentes tratamentos por microscopia de contraste de fase.....	53
<b>Figura 25:</b> Quantificação dos três morfotipos microgliais nos diferentes tratamentos em BV-2.....	54
<b>Figura 26:</b> Quantificação do fenótipo morfológico ativado nos diferentes tratamentos em BV-2.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Estrutura das diferentes cadeias de glicosaminoglicanos.....	17
<b>Tabela 02:</b> Descrição dos grupos experimentais analisados após 12 horas de incubação.....	33

# LISTA DE ABREVIATURAS

AH: ácido hialurônico  
ALS: esclerose lateral amiotrófica  
ATP: Adenosina trifosfato  
AVC: acidente vascular cerebral  
A $\beta$ : peptídeo  $\beta$ -amiloide  
CAT: enzima catalase  
CS: condroitim sulfato  
DA: doença de Alzheimer  
DEX: dexametasona  
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium – Meio Dulbecco eagle modificado  
DNs: doenças neurodegenerativas  
DP: doença de Parkinson  
DS: dermatam sulfato  
EC25: concentração que induz a 25% o efeito máximo  
EC50: concentração que induz a 50% o efeito máximo  
EDTA: etilenodiamino tetracetato  
ELA: Esclerose lateral amiotrófica  
ELISA: ensaio imunossorvente ligado a enzima  
GAGs: glicosaminoglicanos  
Gal: galactose  
GalN: galactosamina  
GalNAc,6S: galactosamina N-acetilada, 6-sulfatada  
GalNAc: galactosamina N-acetilada ou N-acetilgalactosamina  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GlcA: ácido glucurônico  
GlcN: glucosamina  
GlcNAc: glucosamina N-acetilada ou N-acetilglucosamina  
GlcNS,6S: glucosamina N- e 6-dissulfatada  
GlcNS: glucosamina N-sulfatada  
HEP: heparina  
HM: heparina comercial de mamífero  
HS: heparam sulfato  
IdoA: ácido idurônico  
IL-: interleucina  
LPO: peroxidação lipídica  
MEC: matriz extracelular  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NFkB: fator nuclear kappa B  
NO: óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido  
PBS: phosphate buffered saline - Tampão fosfato-salino  
PFA: paraformaldeído  
PnDS: dermatam sulfato de *Phallusia nigra*  
PQ: paraquat  
PG: proteoglicano  
QS: queratam sulfato  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
RNS: espécies reativas de nitrogênio  
SFB: soro fetal bovino  
SN: sistema nervoso  
SNC: sistema nervoso central  
SOD: enzima superóxido dismutase  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

Os microglíocitos são células de defesa do sistema nervoso central, que são ativadas em resposta à patógenos e agentes estressores, estão envolvidos na poda sináptica e na manutenção da homeostase tecidual. Entretanto, a ativação microglial crônica é prejudicial, pois gera disfunção mitocondrial e perda da função celular, que resulta em morte celular neuronal. Esse mecanismo de neuroinflamação é central na progressão de muitas doenças neurodegenerativas (DNs) e, apesar da origem multifatorial, estudos apontam que agrotóxicos induzem o aumento do risco dessas doenças. Moléculas neuroprotetoras, como os glicosaminoglicanos (GAG), que tenham ação sobre os neurônios, vêm sendo estudadas por uma série de efeitos biológicos, inclusive por desempenhar papel antioxidante. Um exemplo é o dermatam sulfato (DS), um GAG encontrado em altos níveis durante o desenvolvimento cerebral de mamíferos e possui atividades neuritogênicas e neuroprotetoras. Interessantemente, o DS encontrado na ascídia *Phallusia nigra* (*PnDS*) possui o mesmo padrão de sulfatação do que o DS encontrado nos sítios neurogênicos de mamífero, IdoUA (2S) -GalNAc (6S). Sendo assim, nesse trabalho foi investigado o papel antioxidante e neuroprotetor do *PnDS* (0,025; 0,05; 0,1 µg/ml) em microglíocitos, utilizando-se a linhagem de microglíocitos murinos BV-2 ativados por um estresse químico induzido pelo pesticida paraquat (PQ). Tais efeitos foram comparados com os efeitos da dexametasona (DEX - 0,2; 0,4 e 0,8 µg/ml), e da heparina de mamífero (HM - 0,025; 0,05; 0,1 µg/ml). Todos os tratamentos foram avaliados 12 h após a exposição através do ensaio de MTT, o qual observou a diminuição da atividade mitocondrial nas células incubadas com diferentes concentrações de PQ, sendo o EC<sub>25</sub> de 25 µM. Tal concentração de PQ, que gera apenas estresse celular, foi utilizada nos demais experimentos. Através do ensaio utilizando a sonda fluorescente H<sub>2</sub>D<sub>2</sub>CFDA, mediu-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular. No grupo de PQ co-incubado com *PnDS* houve uma diminuição na produção de ROS intracelular de forma similar à co-incubação com DEX e HM. A atividade mitocondrial foi restaurada de forma significativa no grupo *PnDS*+PQ, em comparação com o grupo apenas incubado com PQ. O sistema antioxidante enzimático das células também foi avaliado. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não foi aumentada no grupo PQ+ *PnDS*, diferentemente do grupo PQ+HM. Contudo, a atividade da catalase (CAT) foi significativamente aumentada no grupo PQ+*PnDS*. O dano celular foi analisado por meio da peroxidação lipídica (LPO), o qual foi diminuído apenas na co-incubação de *PnDS* (0,025 µg/ml)+PQ. Visto que os microglíocitos mudam sua morfologia quando ativados, a morfologia celular foi analisada por microscopia de contraste de fase. Na concentração de *PnDS* 0,025 µg/ml ocorreu a restauração do morfotipo ramificado e houve diminuição da quantidade de células ameboides, mesmo no grupo co-incubado com PQ. Essa co-incubação também diminuiu o número de células ativadas em comparação com o PQ. Esses dados indicam uma melhor atividade antioxidante e neuroprotetora do *PnDS* sob condições neurodegenerativas em microglíocitos causadas pelo PQ, em comparação a DEX e HM. Elucidar os mecanismos neuroprotetores induzidos pelo *PnDS*, é um campo de pesquisa promissor para a elaboração de um agente terapêutico ideal para DNAs.

**Palavras-chave:** glicosaminoglicano, doença neurodegenerativa, paraquat, BV-2, heparina, dexametasona.

## ABSTRACT

Microglia are defense cells of the central nervous system, which are activated in response to pathogens and stressors, they are involved in synaptic pruning and maintenance of tissue homeostasis. However, chronic microglial activation is harmful, as it generates mitochondrial dysfunction and loss of cell function, which results in neuronal cell death. This neuroinflammation mechanism is central to the progression of many neurodegenerative diseases (NDs) and, despite the multifactorial origin, studies indicate that pesticides increase the risk of these diseases. Neuroprotective molecules, such as glycosaminoglycans (GAG), which act on neurons, have been tested for a series of biological effects, including an antioxidant role. An example is dermatan sulfate (DS), a GAG found at high levels during brain development in mammals and has both neuritogenic and neuroprotective activities. Interestingly, the DS found in ascidian *Phallusia nigra* (*PnDS*) has the same sulfation pattern as the DS found in mammalian neurogenic sites, IdoUA (2S) -GalNAc (6S). Therefore, this work investigated the antioxidant and neuroprotective role of *PnDS* (0.025; 0.05; 0.1 µg/ml) in microglia, using the BV-2 murine microglia lineage activated by a chemical stress induced by the pesticide paraquat (PQ). Such effects were compared with the effects of dexamethasone (DEX - 0.2; 0.4 and 0.8 µg/ml), and mammalian heparin (HM - 0.025; 0.05; 0.1 µg/ml). All treatments were evaluated 12 h after exposure using the MTT assay, which observed a decrease in mitochondrial activity in cells incubated with different concentrations of PQ, with an EC<sub>25</sub> of 25 µM. This concentration of PQ, which generates only cellular stress, was used in the other experiments. Through the assay with the fluorescent probe H<sub>2</sub>DCFDA, the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured. In the PQ group co-incubated with *PnDS* there was a decrease in the production of intracellular ROS similarly to the co-incubation with DEX and HM. Mitochondrial activity was significantly restored in the *PnDS*+PQ group compared to the PQ only incubated group. The enzymatic antioxidant system of the cells was also evaluated. The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was not increased in the PQ+ *PnDS* group, unlike the PQ+HM group. However, catalase activity (CAT) was significantly increased in the PQ+*PnDS* group. Cell damage was analyzed through lipid peroxidation (LPO), which was reduced only in the co-incubation of *PnDS* (0.025 µg/ml) + PQ. Since microglia changes their morphology when activated, cell morphology was observed by phase contrast microscopy. At the concentration of *PnDS* 0.025 µg/ml, the branched morphotype was restored and there was a decrease in the amount of amoeboid cells, even in the group co-incubated with PQ. This co-incubation also decreased the number of activated cells compared to PQ. These data indicate a better antioxidant and neuroprotective activity of *PnDS* under neurodegenerative conditions in microglia caused by PQ, compared to DEX and HM. Clarify the neuroprotective mechanisms induced by *PnDS* is a promising field of research for the development of an ideal therapeutic agent for NDs.

**Keywords:** glycosaminoglycan, neurodegenerative disease, paraquat, BV-2, heparin, dexamethasone.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas (DNs) são patologias caracterizadas pela destruição irreversível de certos neurônios, o que leva à perda progressiva e incapacitante de determinadas funções do sistema nervoso. Algumas delas, são hoje consideradas as maiores causas de demência no mundo e por não existir uma forma conhecida de reverter a progressão da degeneração, as DNs são consideradas incuráveis (BURNS, 2009).

Muitas doenças neurodegenerativas ocorrem como resultado de múltiplos processos em desbalanço em diversos níveis no circuito cerebral abrangendo desde o nível molecular até o sistêmico (BREDESEN *et al.*, 2006). Dentre as doenças que têm a morte celular como uma das principais causas, destacam-se a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (ALZHEIMER, 1907, DUGGER e DICKSON, 2017).

Embora o processo de neurodegeneração permaneça pouco esclarecido, diversos mecanismos podem ser responsáveis por levar os neurônios à morte, incluindo fatores genéticos, mal enovelamento proteico e mecanismos intracelulares como, estresse oxidativo, excitotoxicidade, disfunções mitocondriais, danos à membrana de organelas, apoptose, desregulação da autofagia, bem como neuroinflamação e respostas alteradas da glia (GAN *et al.*, 2018; RANSOHOFF, 2016).

Vários estudos provaram que a exposição crônica a pesticidas em baixa dose é um fator de risco para o desenvolvimento de DNs, incluindo DA, DP, ELA e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) entre outras (PAUL, *et al.*, 2018; YAN, *et al.*, 2018; MARTINS e CARRUTHERS 2014; RICHARDSON *et al.*, 2014). No entanto, ainda existem muitos trabalhadores que sofrem envenenamento não intencional por pesticidas devido à inalação ou absorção pela pele (VAR DER PLAAT *et al.*, 2018). Portanto, de acordo com Yu e colaboradores (2021), é importante estudar o mecanismo patogênico induzidos por pesticidas em DNs e suas medidas preventivas.

### 1.1.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido implicado em muitos distúrbios degenerativos metabólicos e neurológicos. Doenças degenerativas, em que a função e a estrutura de um tecido ou órgão se deterioram com o tempo, como na DA, DP, diabetes, catarata, câncer e doenças cardiovasculares, foram atribuídas às condições de estresse oxidativo e ao processo de envelhecimento natural. Assim, estresse oxidativo, envelhecimento e doenças degenerativas estão interligados (NANDI *et al.*, 2019).

Evidências têm demonstrado que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) está intimamente relacionada com a ocorrência de morte neuronal em várias doenças neurodegenerativas, e apontam a íntima relação entre essa produção, pesticidas e estresse oxidativo (POPA-WAGNER *et al.*, 2013).

#### 1.1.1.1. Geração das espécies reativas de oxigênio

O oxigênio é essencial para diversos processos no organismo, como a oxidação de compostos orgânicos e a produção de energia para o metabolismo celular (COMHAIR e ERZURUM, 2002).

A cadeia respiratória mitocondrial é central para a produção de energia, pois conecta a transferência de elétrons entre os complexos da cadeia respiratória com o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna para gerar o gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP. Além de ser essencial para a produção de energia, a cadeia respiratória também é a fonte predominante de ROS intracelulares, que são produzidas como subproduto da transferência de elétrons (Figura 01) (PEOPLES *et al.*, 2019).

Embora os locais precisos de produção de ROS dentro de cada complexo e os mecanismos pelos quais eles são produzidos não sejam totalmente elucidados, os complexos I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) e III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase) são reconhecidos como as principais fontes de ROS dentro da cadeia respiratória (PEOPLES *et al.*, 2019). Ao longo da cadeia, o oxigênio é reduzido com menos elétrons e acontece a formação das ROS, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (WILSON *et al.*, 2018).

### 1.1.1.2. Mecanismos antioxidantes

Para regular o estresse oxidativo criado por ROS mitocondrial, as mitocôndrias empregam uma intrincada rede de sistemas de eliminação de ROS que trabalham coordenadamente para mitigar esse estresse (Figura 2). Esses mecanismos são divididos em 2 categorias: enzimáticos, como a enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e os mecanismos antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, como a glutathiona, as vitaminas E e C e o  $\beta$ - caroteno (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2018).

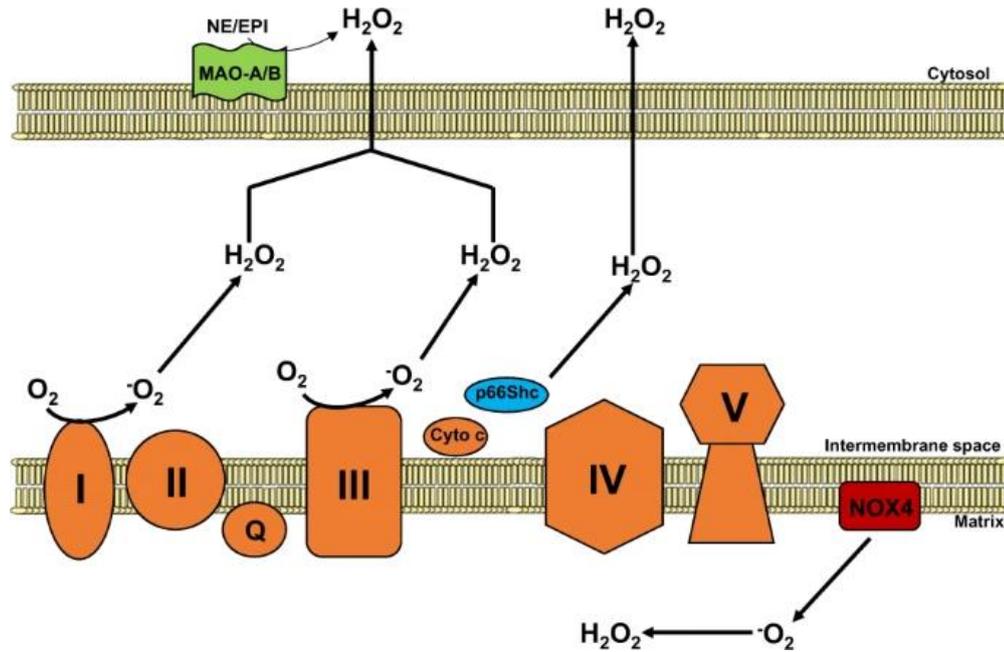
Além de estar presente no citoplasma, a SOD também pode ser encontrada extracelularmente, inclusive na matriz extracelular de tecidos de mamíferos (MARKLUND, 1984). Essa enzima possui uma região polibásica que está envolvida na ligação à heparina/ heparan sulfato (HEP/HS) (ADACHI *et al.*, 1992) e ao colágeno tipo I (PETERSEN *et al.*, 2004).

As enzimas SOD, incluindo Cu-Zn SOD e Mn-SOD, facilitam a dismutação espontânea de radicais superóxido para gerar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é posteriormente removido pelas enzimas CAT e glutathiona peroxidase (SASO e FIRUZI, 2014).

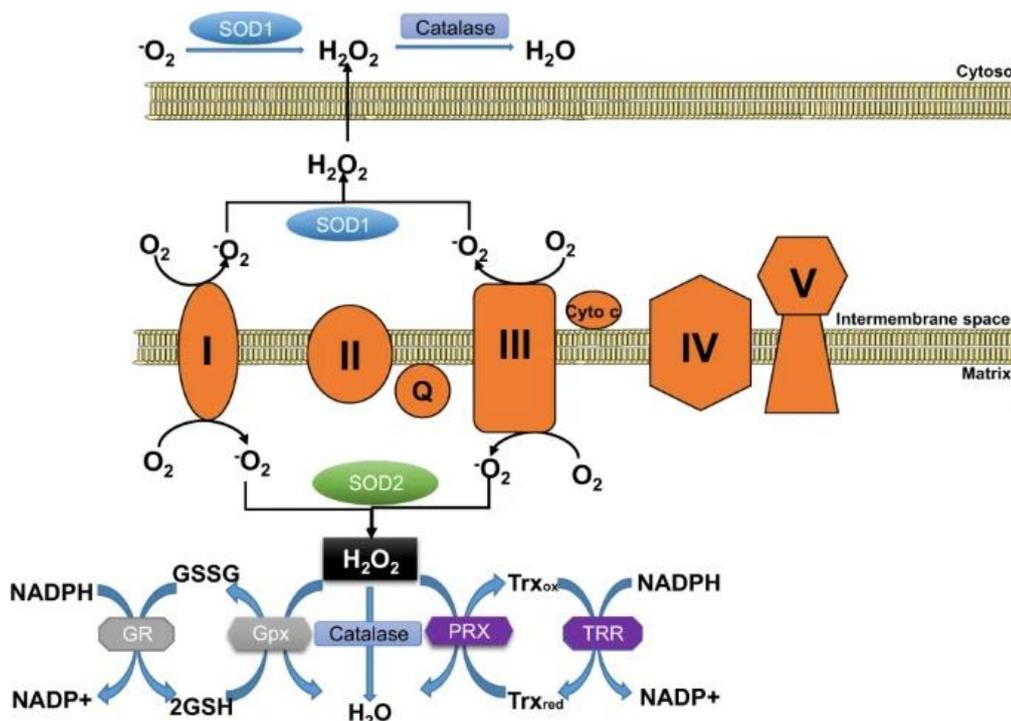
A CAT é uma das enzimas antioxidantes mais importantes. Está presente em quase todos os organismos aeróbicos. Ela realiza a degradação de duas moléculas de  $H_2O_2$  em uma molécula de oxigênio e duas moléculas de água em uma reação de duas etapas (VON OSSOWSKI *et al.*, 1993; DEISSEROTH e DOUNCE, 1970).

A primeira etapa do mecanismo de reação envolve a formação de um composto intermediário que é uma espécie covalente oxiferril, através da redução de uma molécula de peróxido de hidrogênio (IVANCICH *et al.*, 1997). Na segunda etapa da reação, esse composto é reduzido por meio de reações redox por uma transferência de dois elétrons de um doador de elétrons (a segunda molécula de peróxido de hidrogênio) para produzir a enzima livre, oxigênio e água (DEISSEROTH e DOUNCE, 1970).

Os antioxidantes de baixo peso molecular incluem glutathiona, ácido úrico, ácido ascórbico e melatonina, que oferecem funções de neutralização causando a quelação de metais de transição (CHANCE *et al.*, 1979). A glutathiona, que ocorre na forma reduzida (GSH) e, também na forma oxidada (dissulfeto de glutathiona), é o antioxidante endógeno não enzimático mais importante e pode ser regenerada pela glutathiona redutase com consumo de NADPH (GUL *et al.*, 2000).



**Figura 01: Geração mitocondrial de ROS.** Os complexos da cadeia respiratória I e III (laranja) geram superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do oxigênio molecular ( $O_2$ ) dentro do espaço intermembranar mitocondrial. p66Shc (azul), em associação com o citocromo c, participa da sinalização ROS produzindo peróxido de hidrogênio também dentro do espaço intermembranar. A NADPH oxidase 4 (NOX4; vermelho) localiza-se na membrana mitocondrial interna, gerando  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  dentro da matriz mitocondrial. (in PEOPLES *et al.*, 2019).



**Figura 02: Sistemas de eliminação de ROS nas mitocôndrias.** O superóxido ( $O_2^-$ ) é produzido nos complexos da cadeia respiratória I e III e é dismutado por SOD1 (espaço intermembranar e citosol) e SOD2 (matriz) para gerar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A catalase, localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial, converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$ . A desintoxicação mitocondrial de  $H_2O_2$  também pode ser catalisada por glutatona peroxidases localizadas na mitocôndria (Gpx1 e Gpx4) e peroxirredoxinas (PRX3 e PRX5) usando os equivalentes redutores de NADPH (in PEOPLES, *et al.* 2019).

### 1.1.1.3. Desbalanço de ROS na neurodegeneração

O cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo devido a uma tríade de produção elevada de ROS, defesas antioxidantes modestas e uma capacidade limitada de regeneração (COBLEY *et al.*, 2018).

Geralmente, as ROS são produzidas dentro das células em quantidade limitada e são positivamente envolvidas na manutenção da homeostase e das funções celulares (WANG *et al.*, 2013). Em condições normais, os efeitos deletérios da produção de ROS durante o metabolismo aeróbico são neutralizados pelo sistema antioxidante e, dessa forma, o cérebro regula efetivamente seu consumo de oxigênio e a capacidade de geração redox. Quando a produção de ROS excede a capacidade de eliminação do sistema de resposta antioxidante, ocorre extensa oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, causando dano oxidativo, degeneração celular e até mesmo declínio funcional (KNAPP e KLANN, 2002). Isso é considerado um estado de estresse oxidativo e se torna particularmente perigoso para o funcionamento normal do cérebro (SALIM, 2017).

Além disso, as membranas neuronais que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, são altamente suscetíveis a ROS. Na mitocôndria as ROS promovem dano oxidativo do DNA mitocondrial, de proteínas e lipídios, e desencadeiam fragmentação mitocondrial (OGAWA *et al.*, 2005; THAKUR e NEHRU, 2014).

A perda do potencial transmembrana mitocondrial, geração mitocondrial de ATP comprometida, os distúrbios na homeostase mitocondrial de  $Ca^{2+}$ , bem como a produção de níveis nocivos de ROS são aspectos coletivamente referidos como disfunção mitocondrial (BOSE e BEAL, 2016; TERRON *et al.*, 2017).

### 1.1.2. Microgliócitos: estresse oxidativo e neurodegeneração

Existem vários mecanismos importantes pelos quais o estresse oxidativo e a neuroinflamação são intrinsecamente ligados por meio dos microgliócitos. Eles podem ser classificados de três maneiras: (1) produção de ROS relacionada à inflamação, (2) inflamação induzida por ROS como mensageiros secundários e (3) corpúsculos lipídicos nos microgliócitos (SIMPSON e OLIVER, 2020).

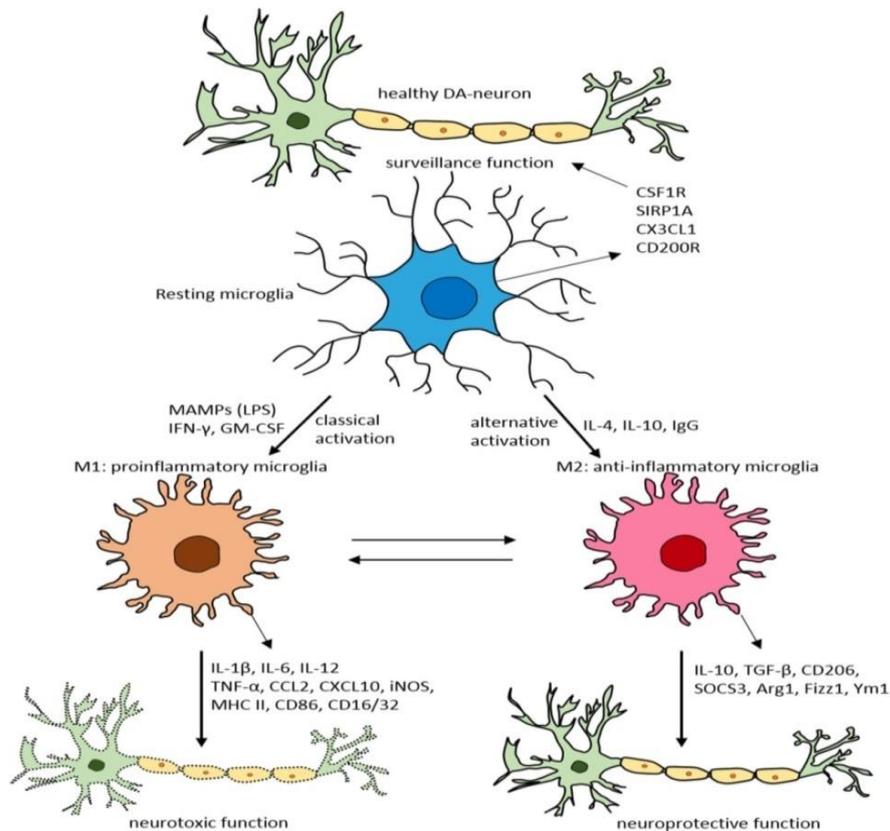
Como fagócitos, os microgliócitos são capazes de mediar uma “explosão oxidativa/respiratória” em resposta a danos e patógenos, incluindo proteínas agregadas e detritos celulares (CLAUDE *et al.*, 2013, HERZOG *et al.*, 2019). Assim, as ROS são uma parte importante do arsenal empregado pelo microgliócito na defesa

tecidual. No entanto, uma vez que existe uma forte correlação entre a ativação imune e o dano oxidativo na DN, supõe-se que a produção elevada e desregulada de ROS por essas células contribua para o estresse oxidativo, levando à morte neuronal (HENEKA *et al.*, 2014).

Microglíocitos, ou micróglia, são células com função imunológica residentes do SNC e desempenham um papel essencial na vigilância e respondem rapidamente às mudanças no SNC (SALTER e BEGGS, 2014). Eles são as menores células da neuroglia, possuem corpo celular alongado com muitos prolongamentos curtos e extremamente ramificados. Não são apenas as primeiras sentinelas imunes da infecção, contribuindo para respostas imunológicas inatas e adaptativas localmente, mas também estão envolvidos na manutenção da homeostase cerebral (NAYAK, ROTH e MCGAVERN, 2014). Dados emergentes estão mostrando papéis novos e fundamentais para o microglíocito no controle da proliferação e diferenciação neuronal, bem como na formação de conexões sinápticas (GINHOUX *et al.*, 2013).

Quanto sua origem, os microglíocitos no parênquima cerebral se originam de macrófagos primitivos no saco vitelino e formam uma população distinta dos macrófagos derivados da medula óssea. Eles podem exibir fenótipos distintos, dependendo do contexto. Isso inclui um fenótipo quiescente em condições normais, um fenótipo 'classicamente ativado' no cenário de infecção e lesão e um fenótipo 'alternativamente ativado' associado a tumores cerebrais (SAIJO e GLASS, 2011) (Figura 03).

O estado de repouso é considerado um processo dinâmico, pelo qual as projeções microgliais pesquisam o ambiente circundante em busca de qualquer perturbação da homeostase, como a interrupção da barreira hematoencefálica (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Uma vez ativada, o microglíocito realiza funções incluindo fagocitose e depuração de detritos e produtos tóxicos do cérebro (MAWUENYEGA *et al.*, 2010; TARASOFF-CONWAY *et al.*, 2015). No estado ativado, os microglíocitos secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento o que as inclui em um espectro entre o fenótipo M1 (pró) e M2 (anti-inflamatório).



**Figura 03: Esquema de estados e função da polarização microglial.** Em condições fisiológicas normais, o microgliócito adquire o fenótipo de vigilância para manter todos os tipos de células do SNC, incluindo neurônios. Para manter esse estado de vigilância, o microgliócito secreta vários fatores. Após a ativação clássica quando desencadeada por LPS, IFN- $\gamma$  ou GM-CSF o microgliócito adquire o fenótipo pró-inflamatório M1 levando à neurotoxicidade pela secreção de várias substâncias pró-inflamatórias. Quando ativado alternativamente por IL-1, IgG ou IL-10 o microgliócito atinge o estado anti-inflamatório M2, levando à neuroproteção por meio da secreção de várias substâncias (*in SUBRAMANIAM e FEDEROFF, 2017*).

Evidências crescentes apoiam que tanto a ativação microglial quanto toxinas ambientais podem desempenhar um papel crítico na etiologia de DNs como fontes crônicas de estresse oxidativo (RICHARDSON *et al.*, 2014).

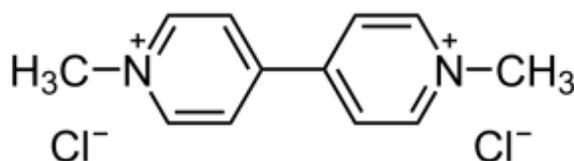
No trabalho de revisão de Taetzsch e Block (2013), é apontado que vários pesticidas demonstraram danificar diretamente os neurônios em altas concentrações e causar ativação microglial em concentrações mais baixas gerando neurotoxicidade. Mais especificamente, lindano, dieldrin, paraquat e rotenona, que apesar de ativar os microgliócitos por mecanismos únicos, convergem em uma via final de produção de ROS nessas células.

### 1.1.3. Pesticida como estressor oxidativo

De acordo com dados de 2020 do Ministério da Agricultura do Brasil, atualmente no país são registrados mais de 2.000 produtos agrotóxicos sendo o

herbicida a classe de agrotóxicos com maior número de registros, totalizando 754. Todos os agrotóxicos registrados no Brasil devem passar por análises toxicológicas para classificá-los de acordo com o risco ao meio ambiente. Ainda, segundo o Ministério da Agricultura, do total de registros de agrotóxicos 49% são considerados altamente perigosos ou muito perigosos para o meio ambiente enquanto somente 15% são considerados pouco perigoso ao meio ambiente. No Brasil, de acordo com a Lei nº 7.802/89 a venda de agrotóxicos e afins aos usuários só pode ser realizada através de receituário prescrito por profissionais legalmente habilitados. De acordo com os dados disponibilizados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, o IBAMA, em 2018, o herbicida PQ encontrava-se na sexta posição dos dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil.

O paraquat (PQ) (dicloreto de 1,1'- dimetil – 4,4'- bipyridínio) (Figura 04) é um herbicida de contato, não seletivo, de ação rápida e largamente utilizado na agricultura por ter baixo custo e grande eficácia (SERRA *et al.*, 2003).



**Figura 04: Estrutura química do Paraquat.** Fonte: [www.chemstech.com](http://www.chemstech.com)

No Brasil ele é vendido através dos nomes comerciais Flak 200 SL, Orbit Gramoxone, Paramaster e Tocha, e, de acordo com a classificação toxicológica, pertence a Classe I, sendo extremamente tóxico e Classe II (muito perigoso) em relação ao risco ambiental.

Na União Europeia o uso de PQ é proibido desde julho de 2007 (CICCHETTI *et al.*, 2009). No entanto, no Brasil o seu uso ainda é permitido pelas autoridades sanitárias (RDC 428/2020).

As doses do PQ recomendadas nas bulas para utilização na agricultura podem variar de acordo com a cultura. Usualmente é recomendado de 1,5 a 2,0 litros do produto comercial por hectare, podendo ser necessárias até 3 aplicações. Quando utilizados pulverizadores terrestres tratorizados é recomendado utilizar no mínimo 200 litros de solução por hectare (bula do produto “Flak 200 SL”).

Os herbicidas têm a capacidade de danificar a parte aérea das plantas e, portanto, a sua aplicação deve ser realizada diretamente nas folhas através de jato.

Essa aplicação deve garantir uma boa cobertura para que o herbicida tenha seu efeito desejado (GWYNNE e MURRAY, 1985).

O mecanismo de ação do PQ nas plantas se deve a sua atuação na cadeia transportadora de elétrons e, o resultado é o desvio da energia captada, que deveria ser para realização da fotossíntese, para a produção de ROS, causando sérios danos às plantas e cumprindo com seu papel de herbicida (MARTINS, 2013).

O pesticida PQ é uma molécula carregada positivamente que é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica através do transportador de aminoácidos após a exposição sistêmica (SHIMIZU *et al.*, 2001) e causar toxicidade seletiva aos neurônios dopaminérgicos do SN (MCCORMACK *et al.*, 2002) (Figura 05).

Como outras neurotoxinas ambientais, o estresse oxidativo parece ser o principal mecanismo de morte celular induzida pelo PQ (FEI *et al.*, 2008). De fato, vários estudos mostraram que o PQ em altas concentrações é capaz de danificar diretamente os neurônios (RICHARDSON *et al.*, 2005), enquanto concentrações mais baixas exercem efeitos neurotóxicos predominantemente por meio da ativação microglial (WU *et al.*, 2005).

#### 1.1.3.1. Ação do paraquat no sistema nervoso

Diversos trabalhos na literatura têm apontado para a ação do PQ também em animais e, não somente nas plantas. A sua aplicação na agricultura tem afetado diretamente os trabalhadores rurais que durante o manuseio dos agrotóxicos, muitas vezes, sem os devidos equipamentos de proteção individual, são expostos ao herbicida. O acúmulo de evidências durante anos tem levado diversos pesquisadores a estudarem os efeitos do PQ no organismo de diferentes espécies, inclusive dos humanos (SILVA *et al.*, 1998; PINHEIRO, 2002; BIGOLIN, 2004).

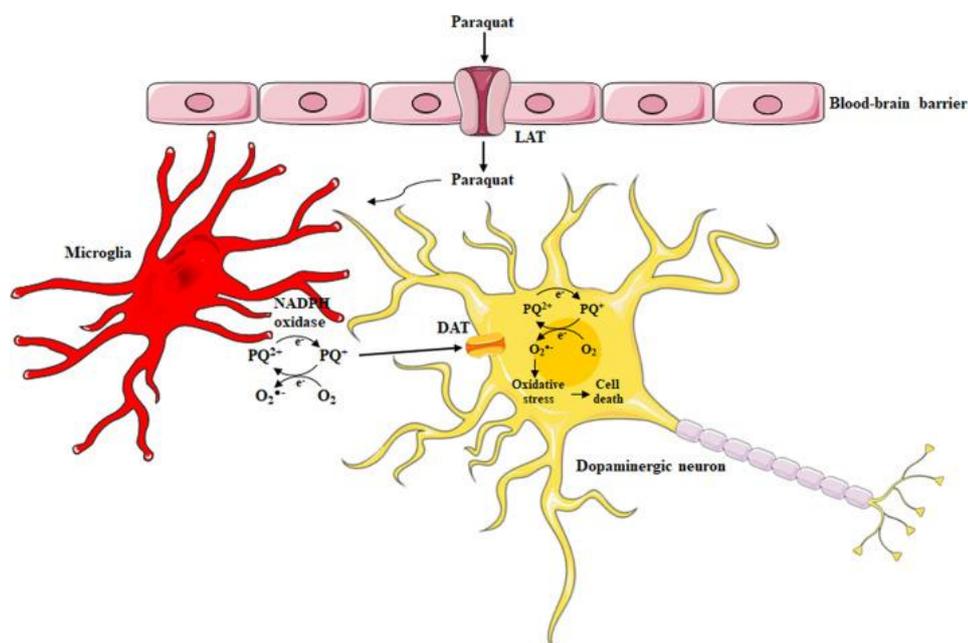
Em humanos, a exposição aguda ao PQ pode causar diversos danos à saúde, sendo um dos órgãos mais afetados os pulmões, levando a um quadro de falência respiratória grave e muitas vezes a morte. O PQ é altamente tóxico podendo causar quadros de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e ainda neurotoxicidade. O prognóstico não é considerado bom, uma vez que, não existe antídoto específico para reverter o quadro de intoxicação (CHANCHAI, 2005).

No organismo humano o mecanismo de ação do PQ consiste também em reações que levarão ao aumento significativo de ROS, desencadeando uma cascata de reações deletérias à homeostase. A exposição prolongada e repetitiva ao PQ tem

sido associada a quadros de degeneração neurológica. Evidências epidemiológicas apontam para uma relação crescente entre a exposição ao PQ e o desenvolvimento da DP (LIOU *et al.*, 1997; PETROVITCH *et al.*, 2002; HERTZMAN *et al.*, 1990).

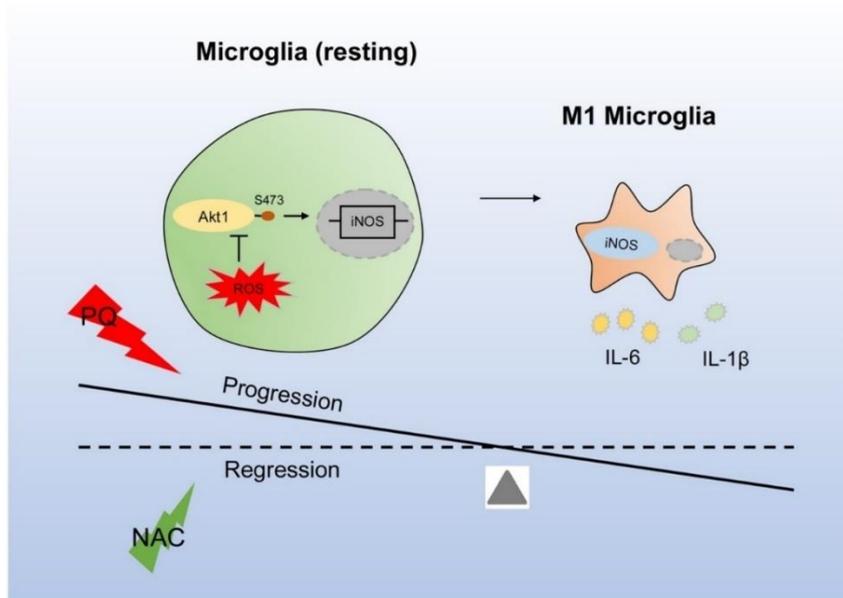
No SNC de humanos o PQ entra nas células através de transportadores de aminoácidos e, consegue chegar até aos neurônios dopaminérgicos através de canais sódio-dependentes (Figura 05). No citosol o PQ sofre reações de oxi-redução sucessivas vezes o que, indiretamente levará a toxicidade das mitocôndrias (CICCHETTI *et al.*, 2009).

Embora o PQ tenha semelhança estrutural com o metabólito tóxico do MPTP (MPP+), um inibidor do complexo mitocondrial I, extensivamente estudado, e neurotoxina dopaminérgica, o PQ é na verdade um inibidor fraco do complexo mitocondrial I (RICHARDSON *et al.*, 2005). Ele é uma molécula que, em seus ciclos de oxi-redução aceita um elétron proveniente da NADPH redutase e forma um radical que, rapidamente na presença de oxigênio é reoxidado gerando o radical superóxido. O radical superóxido pode reagir com o óxido nítrico também presente no citosol e formar o peroxinitrito ou ser dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) e, convertido a peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, na presença de ferro pode ser reduzido ao radical hidroxila, uma ROS muito prejudicial que rapidamente oxida DNA, proteínas e lipídeos (KLEIN e ACKERMAN, 2003).



**Figura 05: Mecanismo de ação do PQ nos neurônios dopaminérgicos do SNC de mamíferos.** Devido às características físico-químicas do PQ ele não tem a capacidade de permear a barreira hematoencefálica e, portanto, necessita de transportadores de sódio-dependente (LAT) e, de transportadores de aminoácidos neutros (DAT) para chegar às células dopaminérgicas. Uma vez dentro da célula o PQ desencadeia uma série de reações que resultam em diferentes ROS capazes de danificar e, levar a célula à morte (*in* COLLE e FARINA, 2021).

Em um estudo realizado por Xiao e colaboradores (2021), utilizou-se células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de PQ (1, 3.3, 10, 33 e 100  $\mu\text{M}$ ) em três diferentes tempos (6, 12 e 24 horas) (Figura 06). O estudo investigou os mecanismos das respostas inflamatórias induzidas por PQ em células BV-2 e tentou revelar o papel da via ROS/Akt1. Seus resultados mostraram que os marcadores de ativação celular das células BV-2 aumentaram após o tratamento com PQ, sugerindo que os microgliócitos BV-2 foram ativados. O PQ induziu as ROS e inibiu a fosforilação de AKT1, proteína que quando ativada está associada à sobrevivência neuronal induzida por fatores de crescimento. Além disso, a expressão dos marcadores do fenótipo pró-inflamatório M1 aumentaram significativamente após o tratamento com PQ. Em células pré-tratadas com NAC (eliminador de ROS), o fenótipo M1 foi diminuído enquanto a Akt1 fosforilada foi restaurada em comparação com a estimulação com PQ. O estudo indicou que PQ induziu a ativação do microgliócito BV-2 pelo aumento da inibição da ativação de Akt1 mediada por ROS, levando à neuroinflamação.



**Figura 06: Balanço entre a progressão do estresse oxidativo gerado pelo PQ em BV-2 e a sua regressão gerada por NAC.** O PQ medeia a ativação do microgliócitos BV-2 aumentando a ROS e inibindo a fosforilação de Akt1. PQ induz a transformação do microgliócitos BV-2 no fenótipo M1. PQ aumenta ROS e inibiu a fosforilação de Akt1 em BV-2. A inibição da produção de ROS diminui o fenótipo M1 em BV-2. A hiperfosforilação de Akt1 inibe o fenótipo M1 do microgliócito BV-2 (*in* XIAO, *et al.*, 2021).

O PQ vem sendo utilizado em estudos como modelo de parkinsonismo tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estudos em animais demonstram que a exposição repetida ao PQ

*in vivo* gera um comprometimento do comportamento motor (CHANYACHUKUL *et al.*, 2004), níveis aumentados de depósitos de  $\alpha$ -sinucleína e de estruturas semelhantes a corpos de Lewy no SN (MANNING-BOG *et al.*, 2003), e perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra de maneira dose dependente (CICCHETTI *et al.*, 2005) que é exacerbada pelo envelhecimento (MCCORMACK *et al.*, 2002). Embora uma única administração sistêmica de doses ambientalmente relevantes de PQ não seja diretamente neurotóxica, as evidências apoiam que ela serve para estimular o microgliócito (PURISAI *et al.*, 2007).

A toxicidade do PQ, pode ser um modelo de escolha para (i) investigar lesões pré-clínicas, (ii) elucidar mecanismos de vulnerabilidade neuronal e (iii) testar agentes para neuroproteção. Esta abordagem pode ser particularmente eficaz para a triagem de estratégias terapêuticas, pois, por exemplo, agentes farmacológicos que neutralizam a neurotoxicidade do PQ, bem como outros modelos de morte celular, podem ser considerados melhores candidatos para neuroproteção (DI MONTE, 2008).

#### 1.1.3.2. Modelo de cultura celular

O papel do microgliócito na neurodegeneração, toxicologia e imunidade é uma área em expansão da pesquisa biomédica cujos estudos requerem um grande número de animais. O uso de uma linhagem celular semelhante aos microgliócitos aceleraria muitos programas de pesquisa e reduziria a necessidade de preparações celulares contínuas obtidas a partir de organismos vivos, e experimentação animal, desde que a linhagem celular reproduza a situação *in vivo* ou os microgliócitos primários apresentem alta fidelidade (HENN *et al.*, 2009).

Os modelos experimentais de mamíferos roedores, invertebrados e linhagens celulares são de grande importância para os avanços tanto na fisiopatologia da DP entre outras DN, bem como no desenvolvimento de novas terapias (BEAL, 2001).

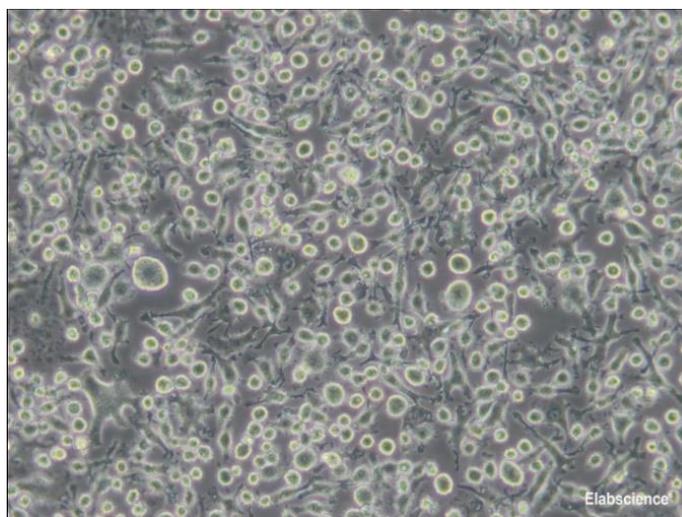
Experimentos *in vitro* feitos a partir do cultivo de células são caracterizados por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou (FRESHNEY, 2015). O propósito de qualquer modelo celular é simplificar variáveis experimentais presentes no organismo inteiro, permitindo a manipulação mais precisa de genes e fatores do ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica, oxigênio e tensão de dióxido de carbono), evitando, ao mesmo tempo, questões éticas complexas associadas ao uso de modelos de mamíferos ou estudos em seres humanos (LÁZARO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2017).

Um tipo de linhagem comumente utilizado é o da célula BV-2, que são derivadas de microgliócito neonatal murino (C57BL/6 *Mus musculus*) imortalizado, transformado por retrovírus. É o substituto mais frequentemente usado para microgliócitos primário. Ele foi usado, por exemplo, para estudos farmacológicos (LUND *et al.*, 2005), estudos de fagocitose (HIRT e LEIST, 2003) e para muitas descobertas imunológicas importantes em pelo menos 200 publicações. Com relação aos estudos de neurodegeneração, o ponto principal é que a BV-2, semelhante aos microgliócitos primários, expressa a NADPH-oxidase funcional, uma enzima frequentemente implicada no dano neuronal (WU *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2007).

Tento em vista a praticidade do modelo celular e a sua relevância para a neurodegeneração, nesse trabalho foi utilizada a linhagem celular BV-2.

As células BV-2 expressam os produtos oncogênicos v-myc e citoplasmáticos v-raf, bem como o antígeno env gp70 no nível da superfície; as células BV-2 possuem marcadores morfológicos, fenotípicos e funcionais de macrófagos (informação disponibilizada pelo BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro, 2022) (Figura 07).

Em um estudo, a BV-2 foi comparada à microgliócitos primários de rato, fazendo um levantamento das proteínas expressas com diversas metodologias de análise, por exemplo, para citocinas medidas por ELISA e foi observada uma similaridade entre essas células. Em outra abordagem, foram obtidos dados sobre a comparação da ativação dos microgliócito murino primário e de microgliócitos *in vivo*. Neste estudo, algumas proteínas induzidas na BV-2 mostraram-se correspondentes à genes regulados positivamente no microgliócito primário (LUND *et al.*, 2006).



**Figura 07: Células BV-2 em cultura.** Aumento de 200X. Fonte: Elabscience- BV-2 cell line

Os microgliócitos desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da neurodegeneração e a compreensão de sua contribuição permitirá aproveitar seu potencial protetor e limitar a inflamação crônica prejudicial. Paralelamente, é importante considerar que o microgliócito assume uma variedade de fenótipos em resposta a estímulos homeostáticos e associados a danos (SANKOWSKI *et al.*, 2019; DECZKOWSKA *et al.*, 2018).

Ao fazê-lo, o microgliócito medeia o equilíbrio entre homeostase benéfica e limitadora de danos e estados inflamatórios crônicos que sustentam a perda neuronal patológica. Assim, identificar os principais alvos moleculares subjacentes às alterações na fisiologia microglial será fundamental para o desenvolvimento de terapias moduladoras antioxidantes e neuroimunes (SIMPSON e OLIVER, 2020).

## **1.2. Estratégias de neuroproteção**

O desenvolvimento de terapias efetivas para as DN representa um grande desafio atual e futuro, visto a relevância socioeconômica destas. As terapias atuais para as DN apenas fornecem benefícios discretos para os sintomas clínicos. Infelizmente, ainda não existem terapias capazes de afetar o desenvolvimento do processo neurodegenerativo dessas desordens. Diante dessa realidade, muitas estratégias terapêuticas neuroprotetoras, com o objetivo de retardar ou impedir a neurodegeneração, têm sido amplamente pesquisadas (GAN *et al.*, 2018; RANSOHOFF, 2016).

Por definição, a neuroproteção é um efeito que pode resultar no salvamento, recuperação ou regeneração do sistema nervoso, suas células, estrutura e função. (VAJDA, 2002).

Para a criação de estratégias neuroprotetoras a ideia é prevenir a progressão de doenças e de danos secundários, interrompendo, ou ao menos retardando, a morte ou a disfunção dos neurônios. Agentes neuroprotetores podem ser utilizados para limitar as consequências e evitar danos cerebrais irreversíveis (KIM, 2010).

Devido à complexidade dos fatores envolvidos nas diversas patogêneses ou em lesões químicas e mecânicas do sistema nervoso, diversos mecanismos são relatados na neuroproteção. Entre eles, por exemplo, está o metabolismo energético fosforilativo, que desempenha um papel importante na indução da morte celular presente nas desordens neurodegenerativas, ao mesmo tempo em que a melhoria da

função mitocondrial tem sido proposta como potencial estratégia terapêutica por vários autores (CUMMINGS, MORSTORF, e ZHONG, 2014).

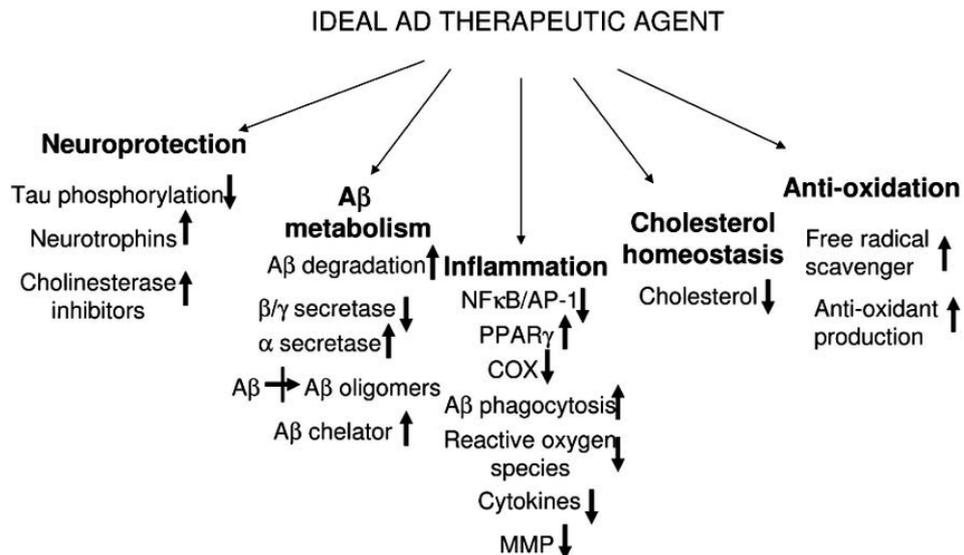
Assim, a mitocôndria se apresenta como um importante alvo para futuras estratégias de neuroproteção com a finalidade de tratamento, prevenção ou retardo da progressão da neurodegeneração (LIN e BEAL, 2006; PALIWAL *et al.*, 2007; SWERDLOW, 2007).

Desta forma, uma grande lista de moléculas, que podem atuar nas mitocôndrias ou em algum desses processos que levam a degeneração (morte, neuritogênese e inflamação) vem sendo estudadas. Em um trabalho publicado em 2007 sobre uma terapia anti-inflamatória e imune para a DA, Walker e Lue propuseram os potenciais alvos para que um agente terapêutico ideal pudesse reduzir a progressão da DA e este deveria ser neuroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante (Figura 08). Para esse fim, futuras terapias que conseguirem regular a ativação dos microgliócitos e evitar excesso de inflamação em estágios específicos da doença alcançarão ótimos resultados.

A atividade antioxidante e, conseqüentemente neuroprotetora de moléculas da matriz extracelular (MEC) presentes no desenvolvimento normal e no crescimento neoplásico, em tecidos neuronais e não neuronais, vem sendo estudadas. Estudos indicam que, em particular, moléculas como a fibronectina, laminina e tenascina, bem como a liberação local de fatores de crescimento, são marcas registradas na cicatrização de várias lesões (BRODKEY *et al.*, 1993).

A MEC é uma rede complexa composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos (PG), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas adesivas, que proporcionam um arcabouço físico para a sustentação da estrutura tecidual, determinando a hidratação e conseqüentemente, o volume do tecido, criando espaços para o transporte de moléculas, a organização dinâmica e a resistência às forças de compressão (GAMBARINI *et al.*, 1993).

Como diversas moléculas da MEC vêm se destacando no papel neuroprotetor, neste trabalho é investigado o papel desempenhado pelos GAGs na função antioxidante e, portanto, neuroprotetora.



**Figura 08: Potenciais alvos que um “agente terapêutico ideal da DA” pode modular para reduzir a progressão da patologia da DA (in WALKER e LUE 2007).**

### 1.2.1. Glicosaminoglicanos

Os GAGs são polissacarídeos sulfatados compostos por uma longa cadeia de dissacarídeos repetidos, lineares e sem ramificação, de modo que um de seus monossacarídeos geralmente é um ácido urônico (glucurônico [GlcA] ou idurônico [IdoA]) e o outro, um açúcar aminado [N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc)] ou ainda uma galactose (Gal) (HOOK, KJELLÉN e JOHANSSON, 1984).

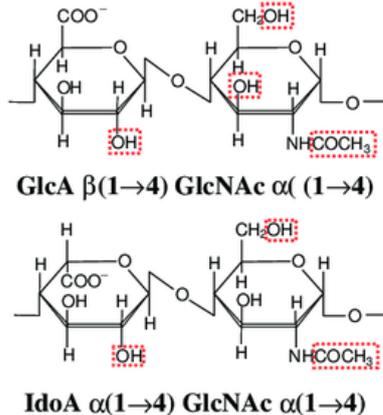
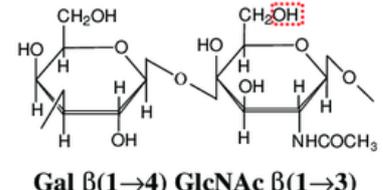
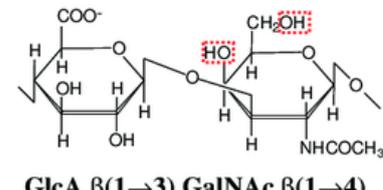
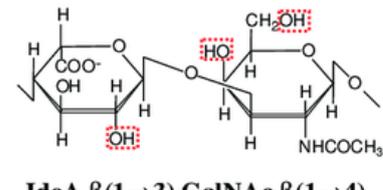
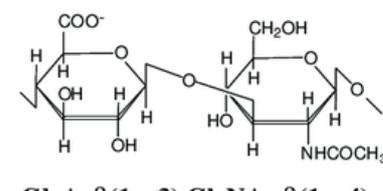
A maioria dos GAGs estão presentes de forma abundante na MEC, que se apresenta como uma rede estrutural complexa, geralmente formando os proteoglicanos (PG) (ALTEI, 2014).

Por serem um dos principais componentes da MEC nos tecidos animais, também participam de outros papéis biológicos como na diferenciação, morfogênese, migração e crescimento celular; além de defesa antiviral, regulação enzimática, modulação de apoptose e neuritogênese (JACKSON, BUSCH e CARDIN, 1991; SAIEDSANTIAGO e BÜLOW, 2018).

Os diferentes tipos de GAGs (Tabela 1) são definidos através dos seguintes parâmetros: tipo de hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina), açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), presença e posição dos grupamentos sulfatos, tipo de ligação glicosídica intradissacarídica e interdissacarídica. São as variações na organização dos dissacarídeos na cadeia,

bem como seus padrões de sulfatação e tamanho, que fazem com que um GAG se diferencie do outro, sendo categorizados em seis principais tipos: heparina (Hep), heparam sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH) (LAMBERG e STOOLMILLER, 1974).

**Tabela 01: Estrutura das diferentes cadeias de glicosaminoglicanos.** A estrutura dos dissacarídeos repetidos nos diferentes tipos de cadeias de GAG é desenhada sem sulfatação. As diferentes posições de sulfatação em cada GAG está delimitada com a caixa vermelha tracejada (*in* PRYDZ, K. e DALEN, K. T. 2000).

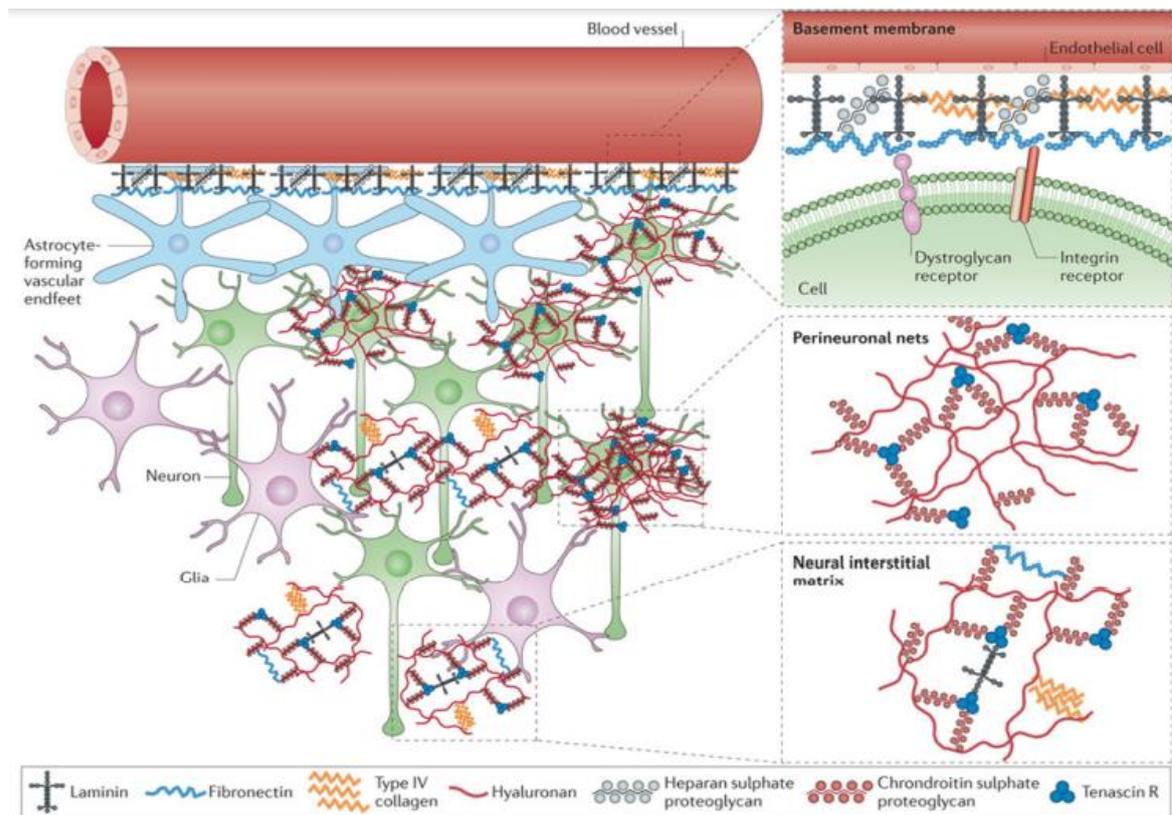
GAG	Hexuronic or Iduronic acid	Galactose	Hexosamine	Disaccharide composition
<b>Heparan sulphate/ Heparin</b>	D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> ) L-iduronic acid ( <b>IdoA</b> )	-	D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )	 <p><b>GlcA <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4) GlcNAc <math>\alpha</math>(1<math>\rightarrow</math>4)</b></p> <p><b>IdoA <math>\alpha</math>(1<math>\rightarrow</math>4) GlcNAc <math>\alpha</math>(1<math>\rightarrow</math>4)</b></p>
<b>Keratan sulphate</b>	-	Galactose ( <b>Gal</b> )	D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )	 <p><b>Gal <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4) GlcNAc <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>3)</b></p>
<b>Chondroitin sulphate</b>	D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )	-	D-galactosamine ( <b>GalNAc</b> )	 <p><b>GlcA <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>3) GalNAc <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4)</b></p>
<b>Dermatan sulphate</b>	D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> ) L-iduronic acid ( <b>IdoA</b> )	-	D-galactosamine ( <b>GalNAc</b> )	 <p><b>IdoA <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>3) GalNAc <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4)</b></p>
<b>Hyaluronic acid</b>	D-glucuronic acid ( <b>GlcA</b> )	-	D-glucosamine ( <b>GlcNAc</b> )	 <p><b>GlcA <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>3) GlcNAc <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4)</b></p>

### 1.2.1.1. GAGs no sistema nervoso

Devido a sua disposição por todo o organismo, os GAGs também estão presentes no SNC, onde encontram-se dispostos na lâmina basal, envolta dos vasos sanguíneos, difusamente distribuídos na matriz intersticial neural e condensados em torno dos corpos celulares e dendritos de neurônios, formando a matriz perineuronal (Figura 09). Possuem papéis de extrema importância no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo atuação na regeneração e plasticidade sináptica, em processos de desenvolvimento embrionário, assim como em processos de neuroinflamação (SANTIAGO, 2004).

Quanto a essa última função, em geral, os GAGs podem interagir com diversas proteínas como citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e enzimas, que modulam processos biológicos de inflamação como migração, endereçamento, crescimento e diferenciação de leucócitos (KÖWITSCH, 2017).

O PGCS e o PGHS são os dois PGs mais comuns no SNC e são expressos por vários tipos de células, incluindo células gliais e neuronais (FARHY, BOISVERT, ALLEN, 2014).



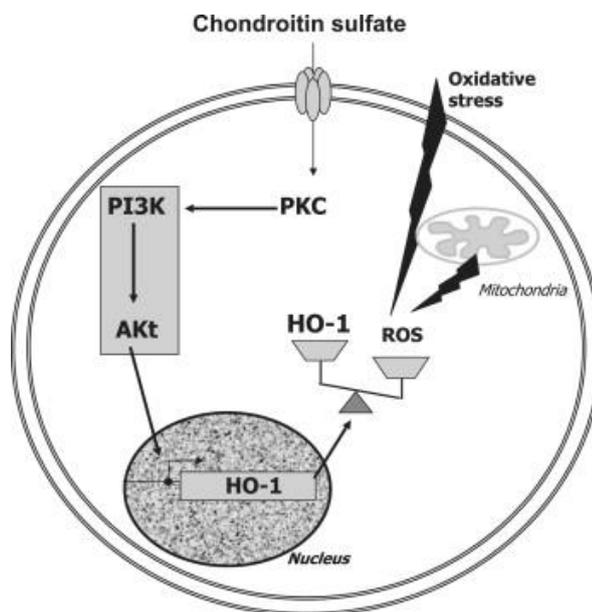
**Figura 09: Componentes da matriz extracelular (MEC) do SN.** Os componentes estão dispostos em lâmina basais que se encontram fora dos vasos cerebrais, condensadas como redes perineuronais em torno dos corpos celulares e dendritos dos neurônios ou difusamente distribuídas como a matriz intersticial neural, entre as células do parênquima do SNC. As células gliais rosa representam astrócitos, oligodendrócitos ou microglíocitos (in JAMAL, *et al.*, 2022).

A diversidade inerente dos GAGs os torna uma ferramenta biológica essencial para regular uma gama complexa de processos celulares. Eles também estão envolvidos nas patologias de vários distúrbios neurológicos, como formação de cicatriz glial e doenças psiquiátricas. É essa diversidade de funções e potencial para intervenções seletivas que torna os GAGs um alvo promissor para estudos (ROWLANDS, SUGAHARA e KWOK, 2015).

#### 1.2.1.2. Ação antioxidante dos GAGs

Redes perineuronais formadas por PGCS podem ter uma ação neuroprotetora contra o estresse oxidativo potencialmente envolvido na neurodegeneração. Na rede perineuronal os GAGs formam estruturas carregadas altamente negativas que podem contribuir para reduzir o estresse oxidativo local, eliminando e se ligando ao ferro redox-ativo, fornecendo assim neuroproteção aos neurônios associados à rede. Verificou-se que esses neurônios são afetados com menos frequência pelo acúmulo de lipofuscina do que os neurônios sem rede, tanto em cérebros humanos de idade normal quanto com DA. Esses resultados sugerem uma função neuroprotetora dos GAGs da rede perineural contra o estresse oxidativo, potencialmente envolvido na neurodegeneração (MORAWSKI *et al.*, 2004).

Foi relatado por Canas e colaboradores (2007), que o CS tem ações antioxidantes e neuroprotetoras em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Nesse estudo, foi utilizado um CS com grupos sulfatados localizados nas posições 4 e 6 na N-acetil-d-galactosamina. Para produzir efeitos neuroprotetores e antiapoptóticos, o CS foi incubado por 24 horas antes de adicionar os agentes produtores de radicais livres ( $H_2O_2$  ou oligomicina combinada mais rotenona). O CS reduziu drasticamente a geração de radicais livres produzidos por tais agentes. Além disso, CS aumentou a fosforilação de Akt e heme oxigenase-1, sugerindo que esta via de sinalização está envolvida em seus efeitos neuroprotetores. Com base nesses resultados, é sugerido que o CS poderia proteger as células SH-SY5Y sob condições de estresse oxidativo, ativando PKC, que fosforila Akt que, via PI3K/Akt, induz a síntese da proteína antioxidante heme oxigenase-1 (Figura 10). Também foi observada a inibição do crescimento de neuritos nas células com o estresse oxidativo. A incubação por 24 horas antes da exposição ao agente estressor levanta a hipótese de que esse tempo foi necessário para induzir enzimas antioxidantes que protegerão os neurônios contra o estresse oxidativo (CANAS *et al.*, 2007).



**Figura 10: Mecanismo proposto para a ação antioxidante e neuroprotetora do CS.** O CS ativa a PKC que aumenta a fosforilação da fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) e ativa a via de sinalização Akt que induz a síntese do antioxidante heme oxigenase-1 (HO-1). O estresse aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio que podem ser neutralizadas pela heme oxigenase-1. (*in* CANAS et al., 2007).

### 1.2.1.3. O Dermatan Sulfato

O CS e o DS estão presentes nas superfícies das células e nas matrizes extracelulares da maioria dos tecidos, e são componentes significativos no cérebro de mamíferos, onde participam do desenvolvimento neural regulando a adesão e migração neuronal, formação de neuritos, e orientação axonal (GRUMET *et al.*, 1996; BANDTLOW e ZIMMERMANN, 2000; OOHIRA *et al.*, 2000; SUGAHARA *et al.*, 2003; SCHWARTZ e DOMOWICZ, 2004). Vários estudos mostraram que o padrão de sulfatação da DS no cérebro é alterada durante o desenvolvimento, caracterizado por um aumento na 4-O-sulfatação e uma diminuição na 6-O-sulfatação (KITAGAWA *et al.*, 1997; AKITA *et al.*, 2008).

Nos humanos, esse último tipo de DS é encontrado em grandes quantidades durante o desenvolvimento do SNC, sintetizado por neurônios e células gliais (oligodendrócitos, astrócitos e microglíocitos) e é crucial para o seu desenvolvimento bem como para sua homeostase (DIETRICH, 1983; ESKO 1991; ROWLANDS *et al.*, 2013).

Esses dois GAGs são formados por misturas de unidades dissacarídicas isômeras. O CS pode ser misto contendo tanto GalNAc sulfatada na posição 4, como sulfatada na posição 6, enquanto DS é invariavelmente um co-polímero contendo IdoA e GlcA (KOLSET e GALLAGHER, 1990; SILBERT e SUGUMARAN, 2002).

Os DSs derivados de mamíferos são compostos principalmente de unidades dissacarídicas repetidas ( $\alpha$ -L-IdoA4  $\rightarrow$   $\beta$ -D-GalNAc3-)<sub>n</sub> que transportam grupos esterificados por sulfatação em posições que variam entre DSs de diferentes tipos e tecidos celulares, bem como seus papéis fisiológicos (SUGAHARA *et al.*, 2003). Essas unidades dissacarídicas são modificadas durante o alongamento da cadeia por sulfotransferases específicas em C-2 de GlcUA/IdoUA e/ou C-4 e/ou C-6 de GalNAc em várias combinações, produzindo assim padrões característicos de sulfatação e enorme diversidade estrutural para cadeias híbridas de CS, DS e CS / DS presentes na mesma molécula de PG (POMIN, 2015).

As cargas negativas, a heterogeneidade da natureza estrutural dos dissacarídeos e o número de unidades dissacarídicas que formam as cadeias de DS são os principais fatores que influenciam sua atividade biológica e farmacológica. O DS possui importante atividade farmacológica, como ação antioxidante e neuroprotetora (KRICHEN *et al.*, 2017; RANI *et al.*, 2017) e atividade antiviral, antiproliferativa e antitumoral (BOUGATEF *et al.*, 2018; VOLPI, 2010). Desempenha ainda papéis importantes em um conjunto diversificado de processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular, cicatrização de feridas e atividade anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória (MENDE *et al.*, 2016; LINHARDT e HILEMAN, 1995).

O DS inibe a formação de coágulos associados à trombina, agindo de forma não sistêmica, com menos efeitos colaterais, enquanto inibe seletivamente a ação da trombina pelo cofator II da heparina (HM) com efeito profibrinolítico. Uma de suas aplicações mais recentes é em dispositivos médicos e na preparação de tecidos artificiais (HIGASHI *et al.*, 2015).

#### 1.2.1.4. O DS de animais marinhos

A bioprospecção de novos fármacos no Brasil é promissora, já que ele abriga uma das maiores biodiversidades marinhas do mundo, favorecendo a descoberta de fontes alternativas de compostos farmacológicos. Resultados bastante interessantes foram obtidos por Nader *et al.*, 1983, mostrando uma maior concentração de GAGs em espécies marinhas de invertebrados, quando comparados a invertebrados de água doce ou terrestres.

Glicanos sulfatados semelhantes aos encontrados nos GAGs de vertebrados foram relatados nos principais filos do reino animal, ocorrendo em Arthropoda,

Mollusca, Annelida, Urochordata, Echinodermata, Coelenterata e Porifera (CÁSSARO, 1977; KOZLOWSKI *et al.*, 2011). Os animais urocordados da classe Ascidiacea, as acídias (Chordata-Tunicata), são invertebrados marinhos e os parentes mais próximos filogeneticamente dos vertebrados (BOURLAT, 2006).

Diferente dos DSs de mamíferos, em ascídias ocorrem diferentes padrões de sulfatação, os quais podem variar entre as espécies. É perceptível que todos os DSs derivados de ascídias contêm muito mais sulfatos esterificados do que os mamíferos (PAVÃO *et al.*, 1998).

Como destacado anteriormente, estudos mostraram a importância das distintas estruturas químicas na cadeia para o desempenho das diversas funções nos GAGs (FAISSNER *et al.*, 1994; CLEMENT *et al.*, 1998; BAO *et al.*, 2005). Estudos comprovaram que o DS de vários organismos marinhos promoveu o crescimento de neuritos em neurônios do hipocampo murino *in vitro* (NADANAKA *et al.*, 1998; CLEMENT *et al.*, 1999; HIKINO *et al.*, 2003; NANDINI *et al.*, 2005).

Foi relatada a ocorrência de um DS GAG semelhante ao DS de mamíferos, nos tecidos da espécie *Phallusia nigra* (Figura 11) (PAVÃO *et al.*, 1998). A *Phallusia nigra* é um animal sésil encontrado em mares tropicais ao redor do mundo e o DS presente em seu corpo chama atenção tanto por apresentar maior quantidade de sulfatações, quanto pelo seu padrão de sulfatação, formado por uma unidade principal (~90%) de iD (IdoUA (2S) -GalNAc (6S) e uma unidade menor (~10%) de iC (IdoUA-GalNAc (6S) (Figura 12) (PAVÃO *et al.*, 1998).

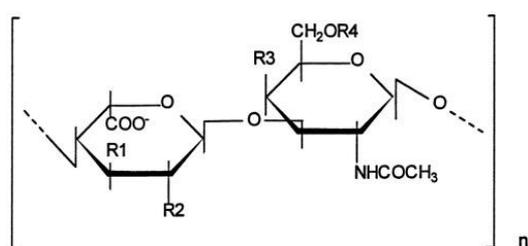


**Figura 11: Ascídia *Phallusia nigra*.** Savigny, 1816. (*in* KONDILATOS, *et al.*, 2010).

Este achado científico possui alta relevância, pois em mamíferos, a quantidade de DS iD [IdoUA (2S) -GalNAc (6S)] em cérebro de adulto é diminuída quando

comparada ao DS encontrado durante o desenvolvimento embrionário (AKATSU *et al.*, 2011). Mas, ainda assim, é encontrada em regiões específicas, como giro denteado e hipocampo, regiões que ainda preservam a neurogênese nos indivíduos adultos (BAO *et al.*, 2005) implicando funções para as estruturas de DS contendo iD (HIKINO *et al.*, 2003).

Ele se liga à vários fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento de hepatócitos (CATLOW *et al.*, 2003), fator de crescimento de fibroblastos 2, pleiotrofina, ligação de heparina, fator de crescimento epidérmico e promove o crescimento de neuritos do hipocampo *in vitro* (HIKINO *et al.*, 2003).



		% of sulfation			
		R1	R2	R3	R4
Mammalian	native	<5	7	95	13
	oversulfated	20	25	100	100
Ascidian	<i>S. plicata</i>	<5	66	94	6
	<i>H. pyriformis</i>	<5	70	99	1
	<i>A. nigra</i>	<5	80	<5	100

**Figura 12: Principais unidades dissacarídicas repetitivas de dermatan sulfato de ascídia e mamífero.** Esses glicosaminoglicanos têm a mesma estrutura principal [4- $\alpha$ -L-IdceA-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-GalNAc-1]<sub>n</sub>, mas têm diferentes padrões de substituições de sulfato. Os dermatan sulfatos de ascidia são altamente sulfatados na posição 2 das unidades de ácido  $\alpha$ -L-idurônico, mas diferem no padrão de sulfatação dos resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina. Nas espécies *Styela plicata* e *Halocynthia pyriformis*, as porções de hexosamina são 4-O-sulfatadas, enquanto em *Phallusia (Ascidia) nigra* elas são 6-O-sulfatadas. No sulfato de dermatan de mamífero parcialmente supersulfatado, a maioria dos resíduos de galactosamina são sulfatados nas posições 4 e 6; os resíduos de ácido  $\alpha$ -L-idurônico não sulfatado, 2-sulfatado e 3-sulfatado estão na proporção de 55:25:20. As unidades dissacarídicas repetitivas do dermatan sulfato de mamífero são sulfatadas no carbono 4 da porção hexosamina, e pequenas quantidades de resíduos de ácido  $\alpha$ -L-idurônico 2-O-sulfatado (~5%) também são encontradas neste glicosaminoglicano de mamífero (*in PAVÃO et al.*, 1998).

Recentemente, em um trabalho do nosso grupo, Sousa e colaboradores (2020), observou que após a lesão com 1,0  $\mu$ M de rotenona, um pesticida de uso comum que serve de modelo de parkinsonismo *in vitro*, seguida do tratamento com 1,5  $\mu$ M de DS

extraído da ascídia *Phallusia nigra* (*PnDS*), houve um aumento notável na atividade mitocondrial em linhagem de neuroblastoma murino, indicando um efeito neuroprotetor dessa molécula nessa concentração. O comprimento dos neuritos também foi avaliado e, observou-se aumento no tamanho no grupo co-incubado com *PnDS*. Além disso, essa molécula apresentou efeito antioxidante, reduzindo consideravelmente a produção ROS, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes como a SOD e CAT. As células incubadas com *PnDS* apresentaram níveis aumentados da capacidade antioxidante total contra os radicais peróxil e foram capazes de proteger as células dos danos, conforme observado pelos níveis reduzidos na peroxidação lipídica. Esses dados indicam promissoras ações do *PnDS* sob condições neurodegenerativas.

Desse modo, a *PnDS*, tem sido investigado por apresentar propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras e neuritogênicas (HIKINO *et al.*, 2003; KOZLOWSKI *et al.*, 2011; PAVÃO *et al.*, 1995, KARAMANOU *et al.*, 2016). Isso demonstra o potencial terapêutico que o *PnDS* possui relacionado às neurodegenerações.

Outras drogas com efeito anti-inflamatório podem ser estudadas no contexto das neuroinflamações. A Dexametasona (DEX), um glicocorticóide sintético e é extensivamente empregada. A DEX é conhecida por possuir efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores em órgãos periféricos por meio da modulação da produção de mediadores inflamatórios pela ligação e ativação de receptores de glicocorticóides (SCHONEVELD *et al.* 2004; SCHWEINGRUBER *et al.* 2012).

No entanto, estudos recentes mostraram que o efeito do glicocorticóide na resposta inflamatória ao cérebro é complexo (DUQUE EDE e MUNHOZ 2016). Embora os efeitos da DEX na inflamação fora do SNC estejam bem documentados, o efeito direto da DEX no SNC e, especificamente, nos microglíócitos ainda é pouco compreendido (SIEGAL *et al.* 1988).

Um GAG que também possui efeitos anti-inflamatórios e é amplamente utilizado na clínica como um anticoagulante é a heparina de mamífero (HM), porém pouco se sabe sobre seus efeitos nos microglíócitos e na interação com proteínas extracelulares. A HM, em modelo animal de neuroinflamação inibiu a proliferação de fibroblastos, contagem de células inflamatórias, edema e angiogênese (BICER *et al.*, 2014) e tem sido associada a doenças de agregação de proteínas, como DA e DP (AHANGER *et al.*, 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

A etiologia das doenças neurodegenerativas permanece amplamente desconhecida, mas acredita-se que seja multifatorial, resultante de fatores genéticos e ambientais. Evidências sugerem que a exposição cumulativa a pesticidas ao longo da vida pode gerar efeitos tóxicos duradouros no sistema nervoso central e contribuir para o desenvolvimento da DA e da DP (YAN, D. et al. 2016). O pesticida paraquat é altamente tóxico podendo causar quadros de neurotoxicidade (CHANCHAI, 2005).

O sistema imunológico emergiu como um fator chave na etiologia e patogênese das doenças neurodegenerativas. A ativação microglial crônica desempenha um papel central na progressão dessas doenças, pois gera estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, mal funcionamento da fagocitose e inflamação excessiva, levando a morte neuronal (JEVTIC et al., 2017).

Devido à falta de tratamento eficaz que permita interromper ou, pelo menos, abrandar o processo neurodegenerativo, as DNs ainda são uma questão médica não atendida e representam um fardo para os pacientes, seus parentes e o sistema de saúde, resultando em um enorme custo econômico e social (MEHTA et al., 2017),

Novas abordagens para tratar tais patologias são necessárias. Pesquisas propõem que para um agente terapêutico ser ideal para a DA ele deve ser neuroprotetor, anti-inflamatório e antioxidante. Dados do grupo já demonstram a capacidade antioxidante e neuroprotetora do *PnDS* em neurônios, porém ainda é necessário caracterizar seus efeitos nos microgliócitos. Para esse fim, futuras terapias que conseguirem ativar os microgliócitos e evitar excesso de inflamação em estágios específicos da doença alcançarão ótimos resultados (WALKER e LUE, 2007).

Portanto, o presente estudo visa avaliar a efetividade antioxidante e neuroprotetora do tratamento com *PnDS*, enquanto compara com outros dois fármacos anti-inflamatórios, sendo um deles um outro GAG, a fim de melhor compreender o papel de suas estruturas químicas em seus potenciais terapêuticos.

Este estudo utiliza um importante modelo para patologias neurológicas, a fim de avaliar as alterações microgliais após lesão química induzida *in vitro* pelo PQ e se faz necessário, pois contribui para pesquisas na área de investigação básica sobre as doenças neurodegenerativas, possibilitando a maior compreensão dos mecanismos celulares envolvidos neste processo além de trazer dados relevantes para o desenvolvimento de futuros potenciais fármacos para o tratamento das doenças neurodegenerativas.

## 3. OBJETIVO

### 3.1. Geral

Avaliar o papel do *PnDS*, comparando com HM e DEX, na neuroproteção e na ação antioxidante utilizando-se a linhagem celular de microgliócitos murinos (BV-2) incubados com PQ.

### 3.2. Específicos

- Avaliar a dose estressora de PQ nos microgliócitos BV-2;
- Avaliar a atividade mitocondrial dos microgliócitos BV-2 incubados ou não com PQ, na presença e ausência de *PnDS*, HM e DEX;
- Analisar a produção de ROS pelos microgliócitos BV-2 incubados ou não com PQ, na presença e ausência de *PnDS*, HM e DEX;
- Investigar a ação das enzimas superóxido dismutase e catalase nos microgliócitos BV-2 incubados ou não PQ, na presença e ausência de *PnDS*, HM e DEX;
- Analisar a peroxidação lipídica dos microgliócitos BV-2 incubados ou não com PQ, na presença e ausência de *PnDS*, HM e DEX;
- Avaliar a morfologia dos microgliócitos BV-2 na presença do *PnDS*; HM; DEX e incubados ou não com o PQ.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Obtenção das ascídias

As ascídias da espécie *P. nigra* foram coletadas na Praia do Forno em Arraial do Cabo (22°57'55.2"S 42°00'53.6"W), transportadas sob aeração constante e controle de temperatura (+/- 25°C) para o biotério aquático localizado no NUPEM/UFRJ – Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé RJ, onde foram também mantidos sob aeração constante, temperatura de 25°C, salinidade e fotoperíodo controlados (12h/12h), alimentados com náuplio de artêmia (48h/48h) (SARDET *et al.*, 2011). A coleta e manutenção dos animais foi concedida pelo SisBio, de acordo com a Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014, com número de licença: 60330-3.

### 4.2. Extração e purificação do dermatam sulfato de *Phallusia nigra*

#### 4.2.1. Extração de PnDS

As vísceras das ascídias *P. nigra* foram retiradas e deslipidadas em acetona (100%) a 4°C, por 24 h. Em seguida, o conteúdo foi levado à estufa (60°C) até que toda acetona evaporasse e obtivesse o peso seco, denominado pó cetônico. Depois, para extração proteolítica, foi adicionado papaína PA (PROQUIMIOS) na proporção de 10% do peso do pó cetônico obtido, e tampão digestão pH 5,5 (0,1 M acetato de sódio, 5 mM de EDTA, e 5 mM de cisteína) utilizando o volume de 10 vezes o peso do pó cetônico. Em seguida as amostras foram levadas para o “banho-maria” a 60°C por 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram centrifugados a 12000 x *g* por 10 minutos e foi retirado e separado o sobrenadante. O precipitado foi submetido à nova incubação com papaína, sob as mesmas condições descritas anteriormente por mais duas vezes (SOUSA *et al.*, 2020).

Ao sobrenadante que continha os polissacarídeos, foi adicionado uma solução de cloreto de cetilpiridina (CPC) (concentração final 0,5%), seguido de 2 volumes de etanol 95%, e mantido a 4°C por 24 h para a precipitação. Após, a amostra foi centrifugada a 12000 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com CPC 0,05% por 7x, e ao *pellet* foi adicionado solução de 2,0 M NaCl e etanol absoluto (100:15, v/v). Nessa amostra, ainda foram adicionados dois volumes de etanol absoluto. Depois, ela foi deixada em repouso por 24 h a 4°C. Seguiu-se com a

centrifugação, descarte do sobrenadante e lavagem do *pellet* duas vezes com etanol 80%. Seguiu-se com nova centrifugação e secagem do *pellet* por 24 h. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em água deionizada e adicionado quantidades crescentes de etanol absoluto, (50% v/v, 75% v/v e 100% v/v) e levadas a 4°C por 1 dia para completa precipitação dos GAGs. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3.000 G por 10 minutos) e o sobrenadante com etanol foi descartado obtendo-se as frações de GAGs. As frações foram liofilizadas (Labconco FreeZone 4.5L) para a secagem do resíduo a 5°C no vácuo (SOUSA *et al.*, 2020; PAVÃO *et al.*, 1995).

## 4.2.2. Purificação de PnDS

### 4.2.2.1. Tratamento enzimático

As amostras obtidas foram ressuspensas em água deionizada e foram incubados com as enzimas condroitinase ABC (Sigma-C3667) ou condroitinase AC (Sigma-C2262) em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA e 15 mM de acetato de sódio, e incubadas a 37°C *overnight* (SOUSA *et al.*, 2020). A enzima Condroitinase ABC catalisa a degradação eliminativa de polissacarídeos contendo as ligações 1,4-β-D-hexosaminil e 1,3-β-D-glucuronosil ou ligações 1,3-α-Liduronosil de dissacarídeos que contenham o grupo 4-deoxi-β-Dgluc-4-enuronosil. Sendo assim, atua sobre o C4S, C6S e DS. Já a condroitinase AC degrada os CS A e C, mas não o CS B (DS). A enzima cliva, por meio de um mecanismo de eliminação, cadeias de polissacarídeos sulfatados e não sulfatados contendo ligações (1-4) entre hexosaminas e resíduos de ácido glucurônico.

### 4.2.2.2. Cromatografia de troca iônica

Após a etapa do tratamento enzimático, iniciou-se a purificação em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose utilizando-se a fração de 75% acoplada a bomba peristáltica. A coluna foi calibrada e eluída com tampão de acetato de sódio a 0,5 M (pH 5,0) a uma velocidade de 1 ml/minuto. O tampão é inserido na coluna e após a aplicação da amostra vai ser responsável por reter apenas os GAGs por sua carga negativa. Sendo assim aplica-se 20 ml de tampão até a completa remoção dos polissacarídeos não-retidos. Os GAGs retidos na coluna são, posteriormente, eluídos com um gradiente crescente tipo *step-wise* de NaCl, em tampão de acetato de sódio nas concentrações de 0,5 M, 0,8 M e 3,0 M (PAVÃO *et*

*al.*, 1995). As frações (25 ml) obtidas de cada concentração foram monitoradas por meio da reação metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) (FARNDALE *et al.*, 1986). As amostras finais obtidas foram liofilizadas e solubilizadas em água deionizada.

#### 4.2.2.3. Cromatografia de Gel Filtração (desalting)

Seguida da obtenção das amostras oriundas dos diferentes gradientes salinos, foi realizada nova liofilização para secagem do resíduo obtido que foi ressuspenso em água deionizada e, então, aplicado na coluna HiTrap Desalting, previamente equilibrada com água deionizada e acoplada em sistema de bomba peristáltica. A uma velocidade de 1 ml/minuto foram aplicados 2 ml da amostra e obtidas frações de 1,5 ml contendo os GAGs. Posteriormente, foram aplicados 30 ml de água deionizada para extração dos sais presentes. Esse procedimento é necessário para a retirada do sal utilizado na cromatografia de troca iônica. O processo de separação da amostra de GAG obtida do sal a ser descartado foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Cytiva – 17140801). Obtendo-se um volume grande torna-se necessária uma nova liofilização, o produto obtido foi solubilizado em água deionizada e utilizado nos experimentos a seguir.

#### 4.2.2.4. Método de Carbazol: Dosagem de Ácido Hexurônico

Os GAGs totais das amostras de *P. nigra* após o processo de extração foram quantificados pela dosagem de ácido hexurônico, utilizando a técnica de reação com carbazol (DISCHE, 1946). Esse método baseia-se no desenvolvimento de cor pela ação de compostos orgânicos como o reagente Carbazol. A dosagem de ácido hexurônico foi realizada com 10 µl de amostra, aos quais se adicionou 190 µl água deionizada e 1,0 ml de ácido sulfúrico P.A. com borato (tetraborato de sódio 0,4%). Depois disso, a amostra foi aquecida por 10 min a 100°C e resfriada à banho de gelo e, após, adicionou-se 40 µl de carbazol (solução na concentração de 0,1% diluído em etanol). Logo depois, ela foi aquecida novamente por 12 min a 100°C e resfriada à banho de gelo. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) em comprimento de onda à 525 nm. A concentração do GAG foi determinada por meio de uma curva-padrão de glicuronolactona (0,5 mg/ml) (SWANN, 1968).

#### 4.2.2.5. Eletroforese de Gel de Agarose

Para se certificar da pureza da amostra e concluir a identificação do *PnDS* dentre os demais GAGs obtidos durante o processo de extração foi realizada a eletroforese em gel de agarose com as amostras intactas e previamente incubadas com enzimas ou realizado tratamento químico utilizados para identificação dos GAGs. Assim, para identificar o CS e o DS foi usado o tratamento enzimático com condroitinase AC (Sigma-C2262) e ABC (Sigma-C3667) e para identificar o HS foi feito tratamento químico com ácido nitroso. Para a reação de deaminação a solução a ser utilizada foi de ácido nitroso preparado na proporção de 1:1 v/v de ácido sulfúrico 0,5 M e nitrito de sódio 1 M. O ácido nitroso realiza clivagem deaminativa que causa a despolimerização das cadeias de heparina e HS (NORGARDSUMNIGHT E VARKI,1995). Dessa maneira a clivagem ocorre entre uma galactosamina N-sulfatada e uma galactosamina N-acetilada, e/ou entre uma galactosamina N-sulfatada e um ácido idurônico. Como esta é uma reação deaminativa, a clivagem independe da presença das sulfatações fazendo com que esta seja específica para heparina e HS, não agindo sobre CS e DS (SHIVELY e CONRAD, 1976). As amostras obtidas foram ressuspensas em água deionizada e foram incubadas com condroitinase ABC ou condroitinase AC (em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA e 15 mM de acetato de sódio) a 37°C overnight, ou tratadas com ácido nitroso à temperatura ambiente por 90 minutos. Uma mistura de GAGs padrão, contendo CS e Hep foram aplicadas em um poço no mesmo gel. Após período de incubação as amostras foram aplicadas (~15 ug) em 0,8% de gel de agarose, em seguida, foi realizada a eletroforese (100 uV – 40 minutos) (BioRad/ Power Pac™ Basic 041BR93482). Após a eletroforese, os GAGs foram fixados no gel com uma solução aquosa de brometo de cetilmetilamônio 0,1% (CETAVLON) e corados com 0,1% azul de toluidina em solução de ácido acético: etanol: água (0,1:5:5, v/v/v) (PAVÃO *et al.*, 1995).

#### 4.2.3. Confirmação do isolamento e caracterização do *PnDS*

Após a coleta das ascídias na Praia do Forno em Arraial do Cabo e manutenção delas nos aquários do biotério passou-se à etapa de extração dos seus GAGs.

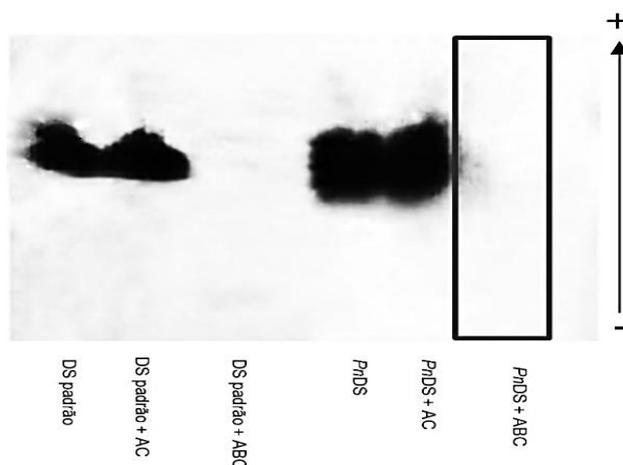
Primeiro com as extrações lipídicas com etanol, seguida da extração proteolítica com papaína. No total, foram realizadas três extrações (1, 2 e 3). Os rendimentos foram decrescentes no decorrer das extrações, totalizando 1,2% (1a), 0,3% (2a) e

0,2% (3a). A purificação dos polissacarídeos por precipitação seriada em etanol resultou na separação de três diferentes frações (50%, 75% e 100%). A utilização da enzima papaína durante o processo de extração e o CPC na etapa de precipitação dos polissacarídeos totais, presentes nas vísceras da *P. nigra* resultou em um rendimento de 2,711 mg. A maior metacromasia foi obtida para a fração 75% da 1a e 3a extração.

A purificação dos polissacarídeos por cromatografia em DEAE-celulose resultou na separação de duas diferentes frações de GAGs (chamadas de F I e F II), eluídas nas concentrações 0,5 e 0,8 M de NaCl, respectivamente. A maior metacromasia foi obtida para a fração F II. Após a separação das frações, F I e F II, ambas passaram por processo de dessalinização, liofilização e ressuspensão em água deionizada.

A concentração do DS foi determinada por meio de uma curva-padrão de glicuronolactona (0,5mg/ml) de modo que a concentração final do *PnDS* obtido foi de 690 µg/ml.

A F II foi analisada por eletroforese em gel de agarose (0,8%), como apresentado na Figura 13. O procedimento eletroforético da fração mostrou: (i) um perfil migratório similar ao padrão de DS (ii) foi sensível ao desafio com a condroitinase ABC e (iii) resistente a ação da condroitinase AC. Esses resultados demonstram que os procedimentos utilizados foram suficientes para obtenção do *PnDS*. Adicionalmente, os dados obtidos são coincidentes ao publicado por Pavão e colaboradores (1995), trabalho em que este GAG foi extraído, purificado e sua estrutura química elucidada.



**Figura 13: Isolamento e caracterização de polissacarídeos totais de *P. nigra* antes e após a incubação com condroitinase AC ou ABC.** Como padrão foi utilizado Dermatom sulfato de mamífero antes e após ser submetido a incubação com condroitinase AC ou ABC. Os polissacarídeos foram aplicados em um gel de agarose a 0,8% em 0,05 M de 1,3-diaminopropano / acetato (pH 9,0), fixados com 0,1% de solução de N-cetil-N, N, N-trimetilamônio após 12 h, e corado (após secagem) com 1% de azul de toluidina (*in* MEDEIROS, T. B. 2021).

Ainda para confirmar a estrutura química do DS na F II, foi feita a avaliação da unidade dissacarídica por HPLC. Pelas razões expostas, confirmamos que esta preparação de PnDS é a que apresenta a seguinte estrutura química: IdoA-(2SO<sub>4</sub>) - GalNAc-(6SO<sub>4</sub>).

### **4.3. Manutenção da linhagem celular de microgliócitos BV-2**

A linhagem celular de microgliócitos BV-2 foi comprada no Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0356). Essa linhagem é proveniente de uma extração do tecido cerebral de *Mus musculus*, possui como propriedade de crescimento uma dupla capacidade; de ser aderente e crescer em suspensão no meio.

As células foram utilizadas para os ensaios quando a confluência atingia em torno de 80%, em seguida o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foi aspirado e a monocamada lavada com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2). Após a lavagem, para o descolamento da monocamada utilizou-se 400 µl de solução de tripsina- EDTA (Sigma T4049) à 2,5% por 10 minutos à 37°C. Posteriormente, as células foram retiradas do frasco e colocadas em tubos Falcon estéreis, completando-se o volume para 3 ml com meio DMEM. O tubo contendo as células foi centrifugado a 4000 x g por 5 minutos e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 4 ml de meio DMEM. Em seguida, foi realizada a contagem das células com azul de trypan à 0,3% em câmara de Neubauer. A densidade aproximada de 5 x 10<sup>4</sup> células/ml foi transferida para a placa de 96 poços e mantidas em 100 µl de meio de cultura ou para a placa de 24 poços e mantidas em 250 µl de meio de cultura e mantidas a 37°C em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> por 24 *overnight* até ser realizado o tratamento e os volumes finais obtidos foram de 200 e 500 µl respectivamente.

Para manter as células em estoque foram realizados congelamentos. As células foram armazenadas em criotubos de 2 ml contendo 950 µl de soro fetal bovino (SFB) e 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados a -80°C por 24 horas. Após este tempo os criotubos são transferidos para nitrogênio líquido.

### **4.4. Desenho experimental**

Para a realização de todos os experimentos listados abaixo foi necessário encontrar o EC-25 do PQ, a fim de gerar um estresse químico nas células ativando-

as para avaliar de forma eficiente os efeitos dos tratamentos, sem a interferência da morte celular.

Após a determinação da dose de EC-25 do PQ, 25 µg/ml, essa única dose foi utilizada nos experimentos subsequentes em conjunto com os outros tratamentos.

As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^4$ . Todos os experimentos seguiram a seguinte ordem de preparo:

- dia 01- plaqueamento das células, são mantidas a 37°C na incubadora com 5% CO<sub>2</sub> *overnight* para sua adesão ao fundo da placa,
- dia 02- tratamento das células
- dia 03- 12 horas depois, ensaios celulares.

Todos os tratamentos foram avaliados no tempo de 12 horas após a exposição e mantidos a 37°C em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> e umidade controlada. Os ensaios foram realizados em quatro experimentos independentes (n = 4) e em triplicata por grupo estudado e, para tais, os respectivos grupos foram estabelecidos (Tabela 02).

**Tabela 02:** Descrição dos grupos experimentais analisados após 12 horas de incubação.

GRUPOS	TRATAMENTO
GRUPO I	Controle - Nenhum tratamento
GRUPO II	Paraquat (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/ml)
GRUPO III	Dexametasona (0,2; 0,4; 0,8 µg/ml)
GRUPO IV	Heparina de mamífero (HM) (0,025; 0,05; 0,1 µg/ml)
GRUPO V	<i>PnDS</i> (0,025; 0,05; 0,1 µg/ml)
GRUPO VI	Paraquat (25 µg/ml) + Dexametasona (0,2; 0,4; 0,8 µg/ml)
GRUPO VII	Paraquat (25 µg/ml) + Heparina de mamífero (0,025; 0,05; 0,1 µg/ml)
GRUPO VIII	Paraquat (25 µg/ml) + <i>PnDS</i> (0,025; 0,05; 0,1 µg/ml)

#### Reagentes comerciais:

- Paraquat: Dicloreto de metil viológeno hidratado. Sigma-Aldrich 856177
- Dexametasona: Sigma-Aldrich D4902
- Heparina de mamífero: Sal sódico de heparina da mucosa intestinal suína. Sigma-Aldrich H3149

#### 4.5. Ensaio de atividade mitocondrial por MTT

O potencial danoso do PQ foi avaliado através de microensaio colorimétrico utilizando MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil brometo de tetrazólio; Sigma-

M2128]. É um dos métodos mais utilizados para determinar a sensibilidade das células ao estresse oxidativo (LIU *et al.*, 1997; SHEARMAN *et al.*, 1994).

Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídios usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) à cristais de formazana (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) sendo dependente da atividade das desidrogenases. Dessa forma, a redução do MTT à formazana, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Devido ao fato do PQ ser uma molécula que interfere diretamente na mitocôndria esse ensaio foi escolhido, principalmente, para avaliar e escolher o seu EC25.

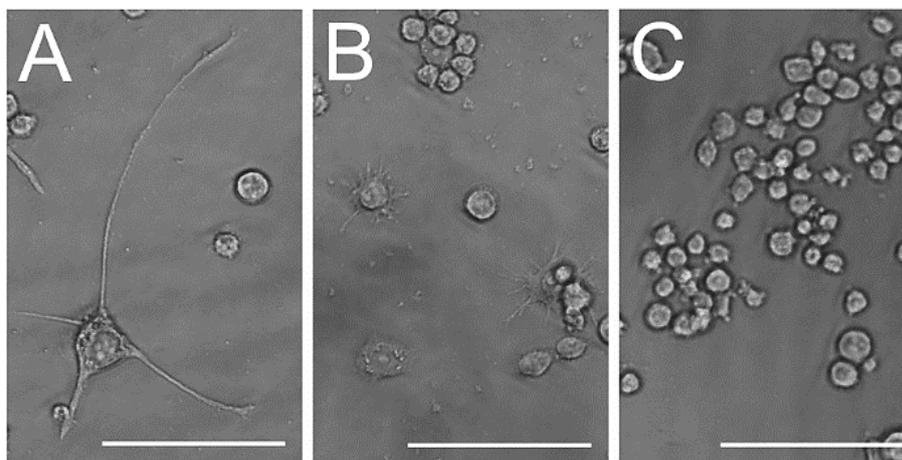
Após plaqueadas e tratadas com as diferentes concentrações de PQ, as células foram mantidas na estufa por 12 h. Em seguida, foram adicionados ao meio de cultura de cada poço 10 µl de MTT (5 mg/ml) para cada 100 µl de cultivo. As placas foram mantidas em estufa por mais 2 h para a metabolização do MTT. Após esse período o sobrenadante foi retirado de cada poço e depois adicionados 200 µl de DMSO, homogeneizando bem para permitir a solubilização dos cristais de formazana. A leitura dos valores da absorbância da placa de 96 poços foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) em comprimento de onda à 570 nm. O ensaio foi realizado em quatro experimentos independentes (n = 4) e em triplicata por grupo estudado.

#### **4.6. Análise morfológica celular por microscopia de contraste de fase**

Os microgliócitos tem uma forma homeostática basal ramificada. Uma vez ativadas, as células se convertem rapidamente em formas arredondadas ou ameboides (DANG *et al.*, 2014). De maneira qualitativa, foram verificados esses três morfotipos celulares, como proposto por Dang e colaboradores (2014).

A ativação celular causada pelo PQ e as possíveis alterações causadas pela Dex, HM e *PnDS* na morfologia celular dos microgliócitos BV-2 foram avaliadas por microscopia de luz em objetiva de contraste de fase, onde foram observados o formato e os prolongamentos celulares, após os diferentes tratamentos correspondentes aos grupos experimentais. Foi realizada a captura de imagem com câmera digital acoplada

a microscópio invertido (Leica-CTR4000) com aumento de 200x. Foram analisadas e quantificadas as células com cada morfotipo (ramificada, ameboide e arredondada) em três campos aleatórios de cada poço de cada triplicata dos grupos experimentais de quatro experimentos independentes (9 fotos por grupo por experimento). Para a análise estatística foi relacionado o (número células ramificadas + células ameboides + células arredondadas por poço) X 100.

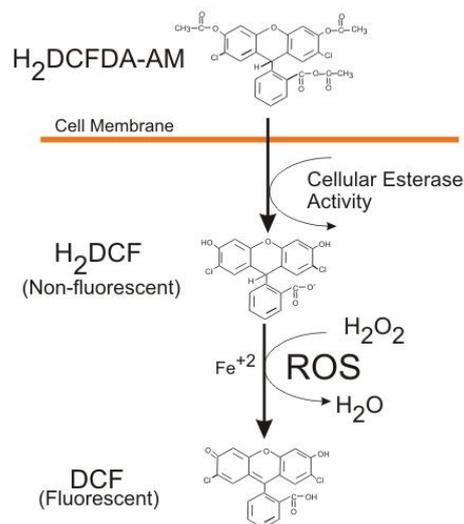


**Figura 14: Tipos morfológicos microgliais avaliados.** A) Célula ramificada, possui grandes prolongamentos e é característica de microgliócitos não ativados. B) Célula ameboide, corpo celular mais arredondado com pequenos e numerosos prolongamentos, característico de microgliócito ativado. C) Células arredondadas, pequeno e arredondado corpo celular. Barra de escala: 100  $\mu$ m

#### 4.7. Quantificação de ROS por citofluorescência

A produção de ROS intracelular foi analisada em triplicata de cada grupo experimental através do reagente H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen Molecular Probes - D399, Estados Unidos) (n= 4 para cada grupo experimental).

O diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína usada como um indicador para ROS em células, por exemplo, para detectar a geração de intermediários reativos de oxigênio em neutrófilos e macrófagos. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, o H<sub>2</sub>DCFDA não fluorescente é convertido na 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente com excitação no comprimento de onda 492–495 e emissão no comprimento de onda 517–527 nm (Figura 15).



**Figura 15: Formação do composto fluorescente DCF por ROS** (Imagem disponível em: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/>).

Para o ensaio foi diluído 0,0005 g do reagente H<sub>2</sub>DCFDA em 200 µl de etanol 100%, dessa solução foi retirado 2,5 µl e adicionado à 4997,5 µl de PBS, totalizando 5 ml, na concentração final de 2,5 µM. Todo o procedimento foi feito protegido da luz, já que essa sonda é fotossensível. A montagem do experimento seguiu a sequência dos três dias já mencionado anteriormente. Todo o sobrenadante dos poços foi retirado e 100 µl da solução final com H<sub>2</sub>DCFDA foi adicionada por poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos e duas lavagens com PBS foram realizadas. As imagens foram feitas no microscópio invertido (Leica-CTR4000) com aumento de até 200x utilizando-se a lente de contraste de fase, para observar as células não coradas, e o filtro de fluorescência com excitação de 488 nm.

A contagem das células marcadas pela sonda H<sub>2</sub>DCFDA foi realizada utilizando o software NIH ImageJ, versão 1.53e. Foi contada a quantidade de células totais e o número de células marcadas por foto, sendo três fotos aleatórias por poço em triplicata de quatro experimentos independentes, a fim de fazer uma porcentagem de células fluorescentes (n=4 poços por grupo experimental).

$$\text{Percentual de células fluorescentes} = \left( \frac{\text{Total de células marcadas}}{\text{Quantidade de células no contraste de fase}} \right) \times 100$$

## 4.8. Análise do sistema antioxidante celular

### 4.8.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase

A fim de determinar a atividade da SOD, os experimentos foram feitos em triplicata de cada grupo experimental, os grupos celulares foram lisado em sonicador ultrassônico a uma potência de 99% e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos à 4°C em 200 µl de tampão de homogeneização.

A atividade da SOD foi determinada através da inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina, quando ocorre a oxidação da adrenalina, um adrenocromo é formado, e este é detectado pelo espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) à 480 nm com tempo total de 2 minutos e intervalo de tempo de 30 segundos. Após a calibração do equipamento com 995 µl tampão de reação (carbonato de sódio 0,05 M, EDTA anidro 0,04M, dissolvido em água deionizada, pH 10,2) e 5 µl de adrenalina 0,3 M (Epinefrina tratate – C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>9</sub>) diluída em água deionizada em uma cubeta de quartzo, foi acrescentado 985 µl de tampão de reação, 10 µl de amostra, 5 µl de adrenalina 0,3 M.

Os resultados foram expressos em unidade (U) de SOD, em que uma unidade de SOD equivale à quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de oxidação da adrenalina (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971; BANNISTER e CALABRESE, 1987) e, com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi realizada a quantificação de proteínas totais nas amostras segundo Bradford (1976).

$$\text{Unidade de atividade específica de SOD} = \left( \frac{\Delta \text{ Absorbância} / \text{min} \times \text{diluição}}{0,071 \times \text{vol da amostra} \times \text{quantidade de proteína}} \right)$$

### 4.8.2. Determinação da atividade da catalase

Para determinar a atividade da enzima catalase (CAT) os experimentos foram feitos em triplicata de cada grupo experimental, os grupos celulares foram lisado em sonicador ultrassônico a uma potência de 99% e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos à 4°C em 200 µl de tampão de homogeneização.

A atividade da enzima foi definida de acordo com o método de Beutler (1975). Já a atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio em uma absorbância de 240 ng/ml, representada por U/mg de proteína (Aebi, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão de reação (Tris base 1 M, EDTA 5 mM, 25°C, pH 8,0) preparada e

titulada no dia da análise. Após a calibração do equipamento em uma cubeta de quartzo, foram colocados 990 µl da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 µl de amostra previamente sonicada.

A reação foi detectada pelo espectrofotômetro (Multiskan Go Thermo scientific®) à 240 ng/ml com tempo total de 60 segundos e intervalo de tempo de 15 segundos. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de CAT, onde uma unidade é a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto e por mg de proteína, em 25 ° C e pH 8,0. Com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi realizada a quantificação de proteínas totais nas amostras segundo Bradford (1976).

$$\text{Unidade de atividade específica de CAT} = \left( \frac{\Delta \text{ Absorbância} / \text{min} \times \text{diluição}}{0,071 \times \text{vol da amostra} \times \text{quantidade de proteína}} \right)$$

#### 4.8.3. Avaliação do dano celular pela peroxidação lipídica

Para avaliar o dano celular nos grupos com os diferentes tratamentos foi verificada a produção de hidroperóxidos lipídicos pelo método de FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method). Esse método tem por princípio a rápida oxidação do Fe<sup>+2</sup> mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe<sup>+3</sup> - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG *et al.*, 1991 e 1992). Para isso, o sobrenadante dos poços foi retirado, foi adicionado 200 µl de metanol e as células foram soltas do fundo dos 24 poços com o auxílio de um raspador de células. As amostras foram colocadas em gelo, submetidas ao ultrassom por 2 min, centrifugadas a 9.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras foram adicionados em microplaca de 96 poços: 20 µl do sobrenadante da amostra mais 180 µl de meio de reação [(laranja de xilenol a 1 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,25 M, FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> (sulfato ferroso amoniacal) a 1 mM (acrescentados na sequência descrita em metanol a 90%)] e água deionizada suficiente para obter 350 µl de volume final. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente em microplacas, foi realizada a primeira leitura da placa à 550 nm de absorbância. Posteriormente, foi adicionado 1 mM hidroperóxido de cumeno (CHP, sigma) após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura da placa de absorbância a 550 nm. O branco foi preparado pela substituição do extrato de células por água. Os níveis de lipoperoxidação foram expressos em termos equivalentes de hidroperóxido de cumeno por grama de massa

úmida de acordo com Monserrat e colaboradores (2003), normalizado pela quantificação de proteínas totais nas amostras segundo Bradford (1976).

#### **4.9. Método de Bradford para a quantificação de proteínas totais**

Com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi necessária a quantificação de proteínas totais nas amostras. Durante os ensaios reservaram-se 100 µl das amostras para quantificação de proteínas. Em microplaca, adicionou-se 10 µl do sobrenadante das amostras (triplicatas) seguidos de 200 µl do reativo de Bradford (“Coomassie brilliant blue” BG-250) e procederam-se as leituras de absorvância à 595 nm. Como branco utilizou-se água deionizada adicionado de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorvância com àqueles provenientes de curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg de BSA por ml de volume final de solução (Bradford, 1976). A curva-padrão e os grupos experimentais foram feitos em triplicata por concentração de BSA.

#### **4.10. Análise Estatística**

Os dados brutos foram coletados a partir de uma série de ensaios independentes. Todas as variáveis expostas tiveram seus pressupostos das análises paramétricas testados. A análise de variância foi realizada pelo teste de ANOVA, seguida pelo pós teste de Tukey para comparação múltipla entre os grupos experimentais: PQ, DEX, HM, *PnDS*, PQ + DEX, PQ + HM e PQ + *PnDS* em relação ao controle no tempo de 12 horas. A potência de uma droga é comumente quantificada como o EC<sub>50</sub>, a concentração que leva a 50% da resposta máxima (ou o logaritmo do EC<sub>50</sub>). E o EC<sub>25</sub> leva a 25% da resposta máxima. Essas doses foram calculadas pelo programa GraphPad Prism 9.00 por uma regressão não linear dos valores das absorvâncias *versus* as concentrações de paraquat.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas sempre que  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com o uso de software GraphPad Prism 9.00 (GraphPad Software).

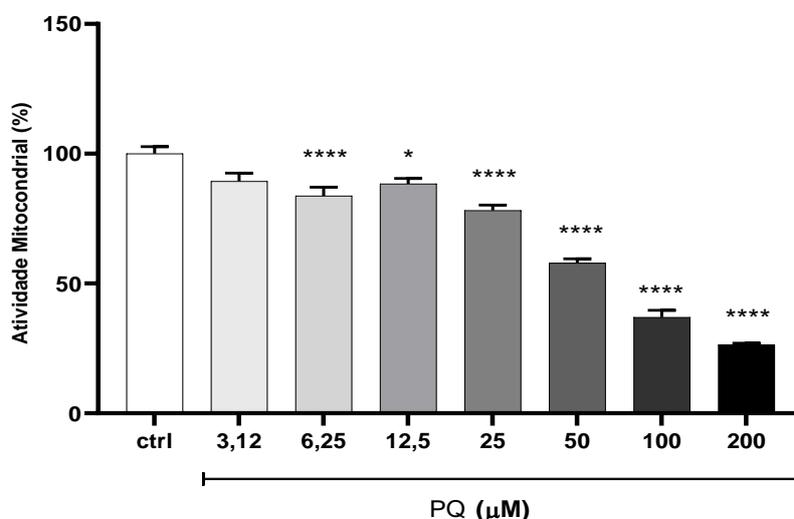
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Diminuição da atividade mitocondrial pelo PQ em microgliócitos BV-2

Em uma etapa inicial os microgliócitos BV-2 foram expostos a concentrações crescentes de PQ para escolha da dose a ser utilizada nos experimentos seguintes. Após análise bibliográfica, foram escolhidas as concentrações: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  para serem testadas nas células BV-2 (RICHARDSON *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2022).

Os grupos tratados foram avaliados quanto à atividade mitocondrial como método para analisar a viabilidade celular pelo ensaio de MTT no tempo de 12 horas. Após esse período de exposição ao PQ foi observado uma resposta dose-dependente quanto a atividade mitocondrial e, a concentração efetiva tóxica de 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) e de 25% ( $\text{EC}_{25}$ ) foi de 59,96  $\mu\text{M}$  e 24,51  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Dessa forma, as concentrações de PQ utilizadas mais próximas dos valores de  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{EC}_{25}$  foram as de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  em 12 horas de incubação, com diminuição significativa da viabilidade celular para (57,8%  $\pm$  1,68%) e (78,16%  $\pm$  2,1%), respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 16). A dose de  $\text{EC}_{25}$  foi escolhida a fim de apenas causar estresse celular para os ensaios subsequentes e não predominantemente morte.



**Figura 16: Atividade mitocondrial em células BV-2 tratadas com diferentes concentrações de PQ.** Análise da atividade mitocondrial pelo método de MTT, na linhagem BV2 plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço exposta à diferentes concentrações de PQ; pelo período de 12 horas. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos erro padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes ( $n=4$ ). A distribuição foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Em seguida, utilizou-se o teste paramétrico ANOVA para comparação de mais de dois grupos seguido do pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*) ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*\*\*) ( $p \leq 0,0001$ ).

## 5.2. Mudanças morfológicas em microgliócitos BV-2 ocasionadas por diferentes concentrações de PQ

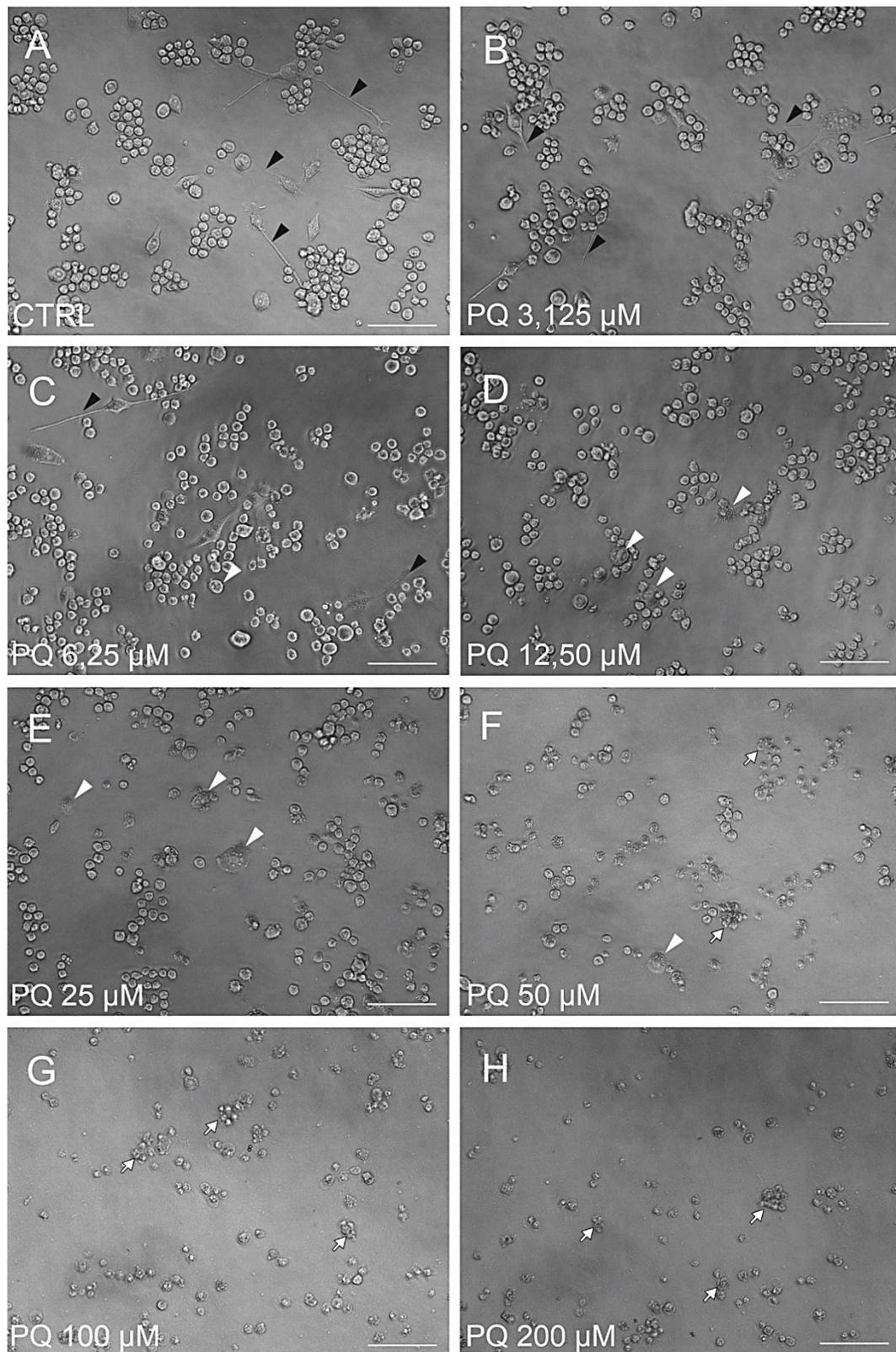
Após observar o decréscimo na atividade mitocondrial realizou-se a análise da morfologia celular dos grupos tratados com as diferentes concentrações de PQ, para isso foi utilizada a microscopia de contraste de fase no aumento de 200X (Figura 17).

No grupo controle (sem nenhum tratamento) nos grupos PQ 3,125  $\mu$ M e PQ 6,25  $\mu$ M foram observadas células com grandes prolongamentos, morfologia típica de microgliócitos não ativados (Figura 17: A, B e C).

Nos grupos em que se utilizou as concentrações de PQ 12,5  $\mu$ M e PQ 25  $\mu$ M verificou-se uma menor proporção de células alongadas e um surgimento de células com morfologia ameboide, corpo celular mais arredondado com prolongamentos curtos e numerosos, característico de microgliócito ativado (Figura 17: D e E).

Nos demais tratamentos com as maiores concentrações, PQ 50  $\mu$ M, PQ 100  $\mu$ M e PQ 200  $\mu$ M, observou-se o surgimento de *debri* celular e a formação de formas celulares semelhantes à corpos apoptóticos com *bubbling* de membrana, principalmente nas concentrações de 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M de PQ, indicando sua alta toxicidade (Figura 17: F, G e H).

Em suma, a concentração de 25  $\mu$ M de PQ foi a concentração escolhida para os posteriores ensaios, visto que a observação de células ameboides em maior quantidade nesta concentração é semelhante à concentração do cálculo do EC<sub>25</sub> feito através do experimento anterior, o ensaio de MTT (Figura 16).



**Figura 17: Morfologia de células BV-2 tratadas por diferentes concentrações de PQ.** Micrografia por contraste de fase das células BV-2 após exposição a diferentes concentrações de PQ (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ). As cabeças de seta pretas indicam em A, B e C: células com grandes prolongamentos, morfologia característica de microglíocito não ativado; As cabeças de seta brancas indicam em C, D e E: células com aspecto amebóide com muitos e pequenos prolongamentos, característico de microglíocito ativado; As setas brancas indicam em F, G e H: *debris* celular após lesão por diferentes concentrações de PQ. Concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

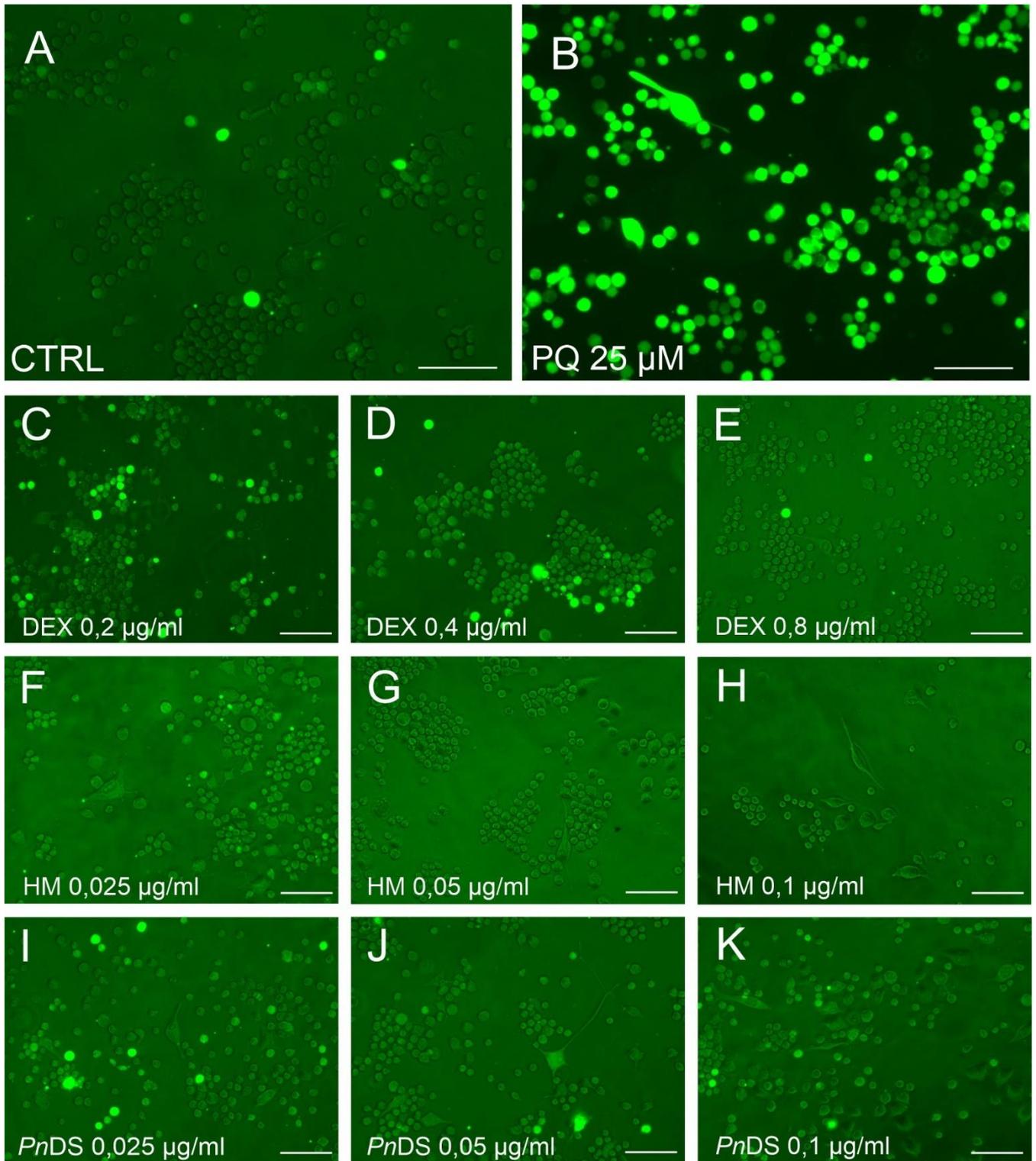
### 5.3. Diminuição da produção de ROS pelo *PnDS* co-incubado com PQ

Para avaliar a influência do *PnDS* na produção de ROS intracelular foi realizada a citofluorescência com a sonda H2DCFDA em 12 horas de tratamento. No controle, apesar de não haver nenhum tratamento, é observada pequena marcação, em poucas células (Figura 18 A e 18 A). Por outro lado, o grupo PQ 25  $\mu$ M, exibiu elevado número de células marcadas (Figura 18 B e 18 B).

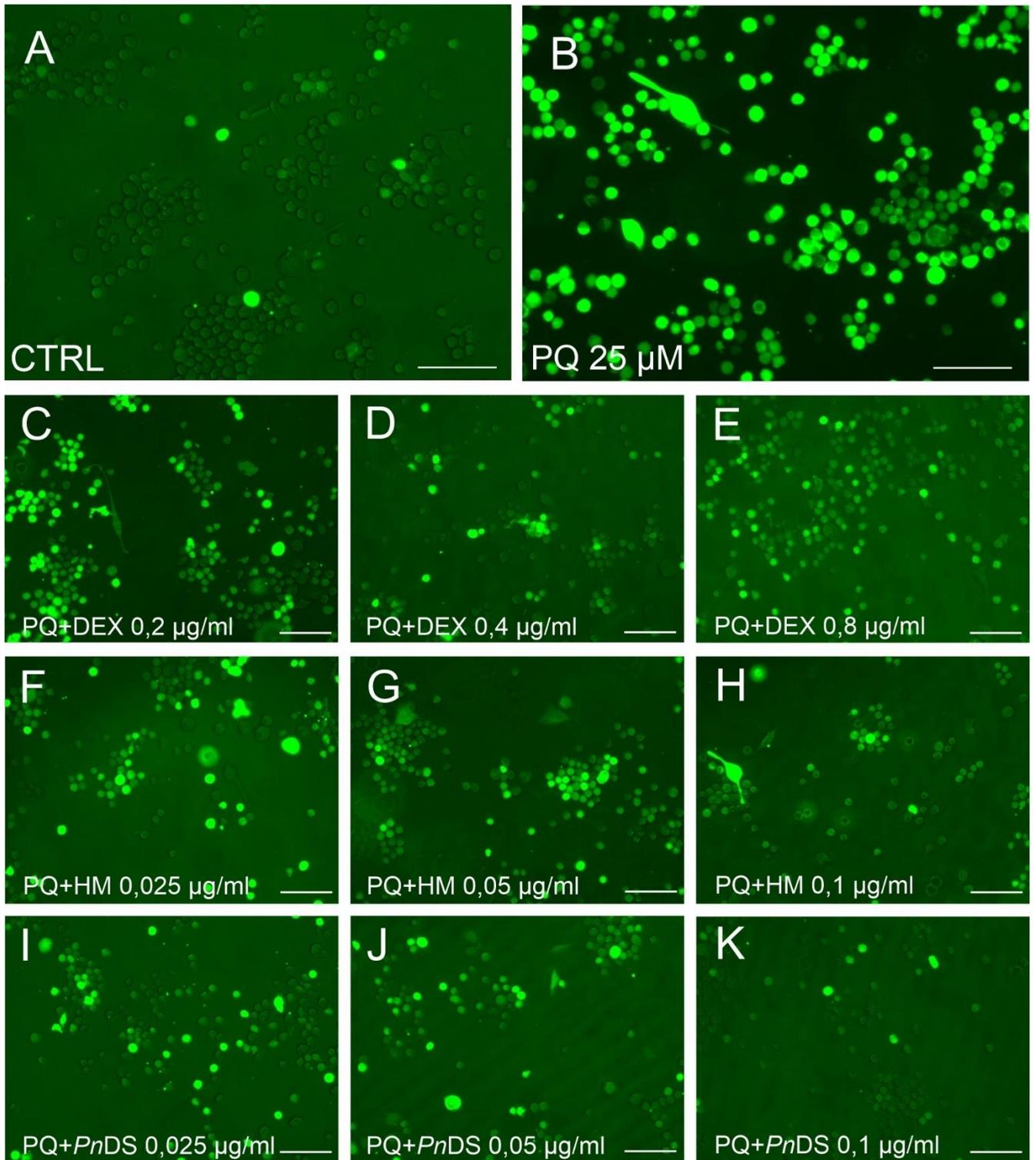
No grupo incubado apenas com DEX, na menor concentração de 0,2  $\mu$ g/ml observou-se mais células marcadas, quando comparado com as concentrações de 0,4  $\mu$ g/ml e 0,8  $\mu$ g/ml e o controle (Figura 18: C, D e E).

Já os grupos tratados apenas com as diferentes concentrações de HM (Figura 18: F, G e H) ou *PnDS* tiveram menos marcação do que o próprio controle (Figura 18: I, J e K).

Nos grupos tratados com a co-incubação com PQ o número de células marcadas aumentou comparado ao controle, porém, mesmo variando nas concentrações, todos os tratamentos e as diferentes concentrações apresentaram aproximadamente ter a mesma proporção de células marcadas (Figura 19: C-K). Tanto nos grupos incubados apenas com os tratamentos tanto nas co-incubações + PQ, não houve mudança no número total de células por poço.



**Figura 18: Produção de ROS intracelular em células BV-2 tratadas com PQ e diferentes concentrações de DEX, HM e PnDS.** Microscopia de contraste de fase e citofluorescência para H<sub>2</sub>DCFDA para avaliar a produção de ROS intracelular nas células BV2. Grupos sem co-incubação com PQ 25 μM. A- Grupo controle sem tratamento. B- Grupo tratado com PQ 25 μM. C-E: tratamento com dexametasona em diferentes concentrações. F-H: tratamento com heparina de mamífero em diferentes concentrações. I-K: tratamento com PnDS em diferentes concentrações. O resultado foi obtido no tempo de 12 horas após o tratamento (n = 4 experimentos independentes). Concentração de 5 x 10<sup>4</sup> céls/poço. Barra de escala: 100 μm.



**Figura 19: Produção de ROS intracelular em células BV-2 tratadas com PQ e diferentes concentrações de DEX, HM e PnDS co-incubados com PQ.** Microscopia de contraste de fase e citofluorescência para H<sub>2</sub>DCFDA para avaliar a produção de ROS intracelular nas células BV2. Grupos co-incubados com Paraquat 25  $\mu$ M. A- Grupo controle sem tratamento. B- Grupo tratado com PQ 25  $\mu$ M. C-E: tratamento com DEX+PQ. F-H: tratamento com HM+PQ. I-K: tratamento com PnDS +PQ. O resultado foi obtido no tempo de 12 horas após o tratamento (n = 4 experimentos independentes). Concentração de  $5 \times 10^4$  céls/poço. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Para confirmar os dados qualitativos observados nas imagens, foi realizada a quantificação da marcação de fluorescência intracelular. Como descrito na metodologia, a porcentagem de células marcadas foi feita com a finalidade de determinar qual seria a menor concentração de cada tratamento com potencial ação antioxidante mesmo com a co-incubação com PQ (Figura 20 I e II).

Tanto o controle quanto apenas os tratamentos apresentaram uma baixa taxa de fluorescência, ou seja, pouca produção de ROS. Por sua vez, a incubação com PQ promoveu alta expressão de ROS ( $80\% \pm 2,58\%$ ) comparada ao controle. Apesar de no gráfico está representado uma média de ( $13\% \pm 2,89\%$ ) de fluorescência no grupo DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , isso não foi estatisticamente significativo comparado com o controle.

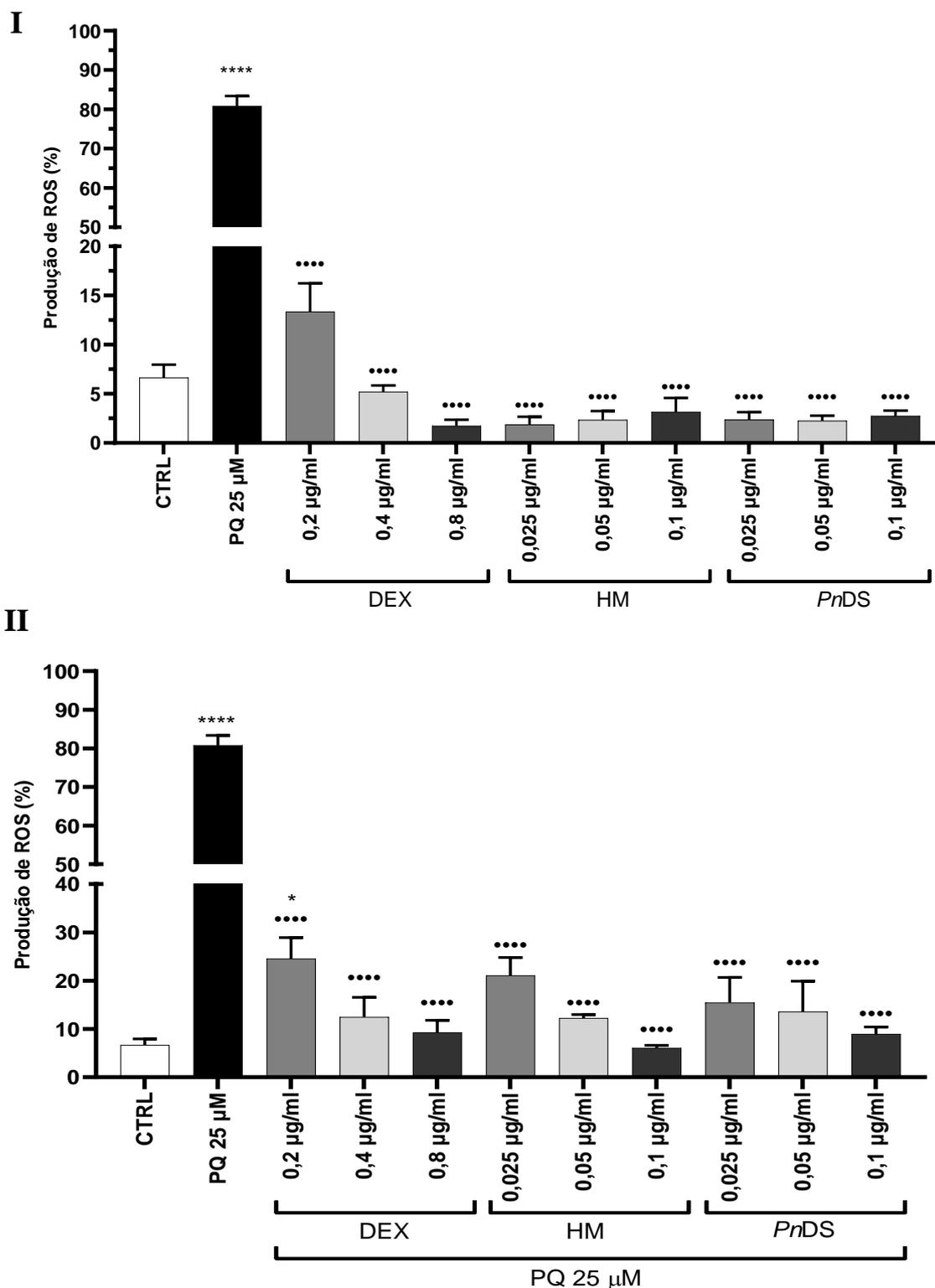
Todos os tratamentos puros tiveram uma redução na marcação quando comparados com o grupo PQ. Com exceção de DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , todos os tratamentos puros tiveram uma marcação em torno ou abaixo de 5% (Figura 20 I).

Mesmo com a co-incubação com 25  $\mu\text{M}$  de PQ (Figura 20 II) foi perceptível que não houve um aumento de marcação. Apenas a menor concentração de DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$  + PQ aumentou a produção de ROS comparada ao controle. E todas as co-incubações diminuíram a produção de ROS, comparada ao grupo PQ 25  $\mu\text{M}$ .

Embora a observação do gráfico Figura 20 II demonstre uma queda na produção de ROS dose-dependente, não houve diferença estatística entre as concentrações de DEX, HM e *PnDS* co-incubados com PQ.

Ao avaliar os tratamentos com 12 horas, a co-incubação com PQ mais a menor concentração de DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$  levou a produção de ROS para ( $24,5\% \pm 4,33\%$ ), a de HM 0,025  $\mu\text{g/ml}$  para ( $21\% \pm 3,71\%$ ) e de *PnDS* para ( $15,5\% \pm 5,2\%$ ).

Por não haver diferença estatística entre as três concentrações de cada tratamento co-incubado com PQ, foram escolhidas as menores concentrações desses, DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , HM 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , *PnDS* 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , para os experimentos subsequentes (Figura 20 II).

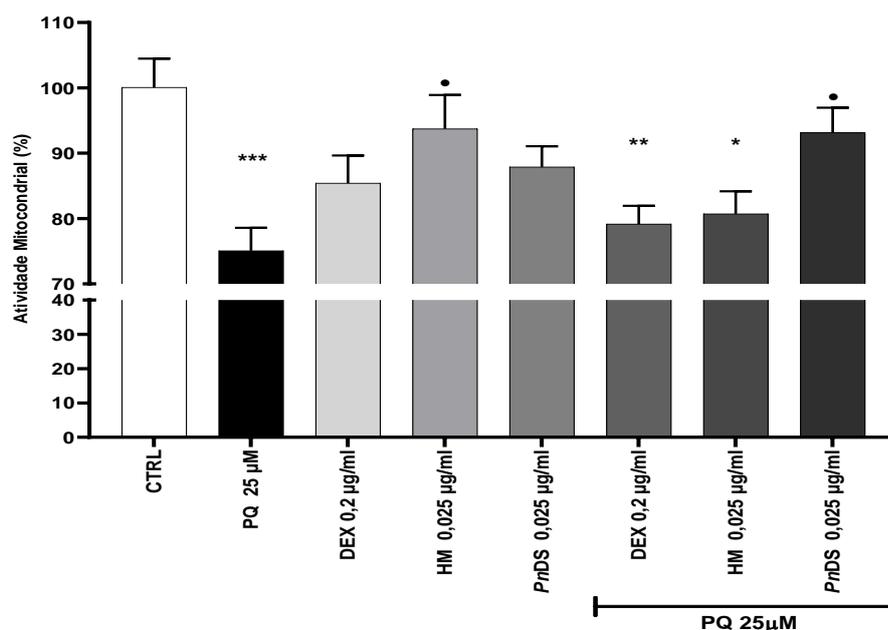


**Figura 20: Quantificação por citofluorescência H2DCFDA da produção de ROS intracelular nas células BV-2.** I) Grupos sem a co-incubação com PQ 25 μM e II) Grupos com a co-incubação com PQ 25 μM. O resultado foi obtido no tempo de 12 horas após o tratamento (n=4 experimentos independentes) em ensaio de H2DCFDA utilizando microscópio de fluorescência, a quantificação foi feita utilizando o programa NIH ImageJ, versão 1.53e. A distribuição foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Em seguida, utilizou-se o teste de One-way ANOVA para comparação de mais de dois grupos, seguido do teste post Tukey. As barras representam as médias das análises triplicadas, com seus respectivos desvios padrão. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*) ( $p \leq 0,05$ ), (\*\*\*\*) ( $p \leq 0,0001$ ) e ao grupo Paraquat (\*\*\*\*) ( $p \leq 0,0001$ ).

#### 5.4. Restauração da atividade mitocondrial pelo *PnDS* co-incubado com PQ em BV-2

Para analisar se houve mudanças na viabilidade mitocondrial das células tratadas com DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , HM 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , e *PnDS* 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , e esses tratamentos mais a co-incubação com PQ 25  $\mu\text{M}$  foi feito novamente o teste de MTT nesses grupos após 12 horas (Figura 21).

Como já esperado a incubação apenas com PQ 25  $\mu\text{M}$  reduziu a atividade mitocondrial para (75%  $\pm$  3,51%), como também demonstrado anteriormente (Figura 16). Os grupos sozinhos não apresentaram diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, porém HM sozinho induziu um aumento da atividade mitocondrial comparada ao PQ. Já os grupos DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$  e HM 0,025  $\mu\text{g/ml}$  co-incubados com PQ tiveram uma redução significativa na atividade mitocondrial com atividade de (79%  $\pm$  2,79%) e (80%  $\pm$  3,45%), respectivamente. Diferentemente de *PnDS* + PQ, que não teve redução significativa da atividade mitocondrial quando comparado ao controle, porém teve um aumento significativo comparado ao grupo PQ 25  $\mu\text{M}$ , com atividade de (93%  $\pm$  3,77%). Ou seja, o *PnDS* restaurou e/ou evitou a perda da atividade mitocondrial nas células co-incubadas com PQ.



**Figura 21: Atividade mitocondrial em células BV-2 com os diferentes tratamentos e co-incubadas com PQ.** Análise da atividade mitocondrial pelo método de MTT, na linhagem BV-2 plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço exposta aos diferentes grupos experimentais avaliados em 12 horas. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes ( $n=4$ ). A distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, utilizou-se o teste paramétrico One-way ANOVA para comparação de mais de dois grupos seguido do-pós teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*) ( $p \leq 0,05$ ), (\*\*) ( $p \leq 0,01$ ), (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ) e ao PQ (\*) ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.5. Modulação da atividade do sistema antioxidante celular pelo *PnDS* co-incubado com PQ em BV-2

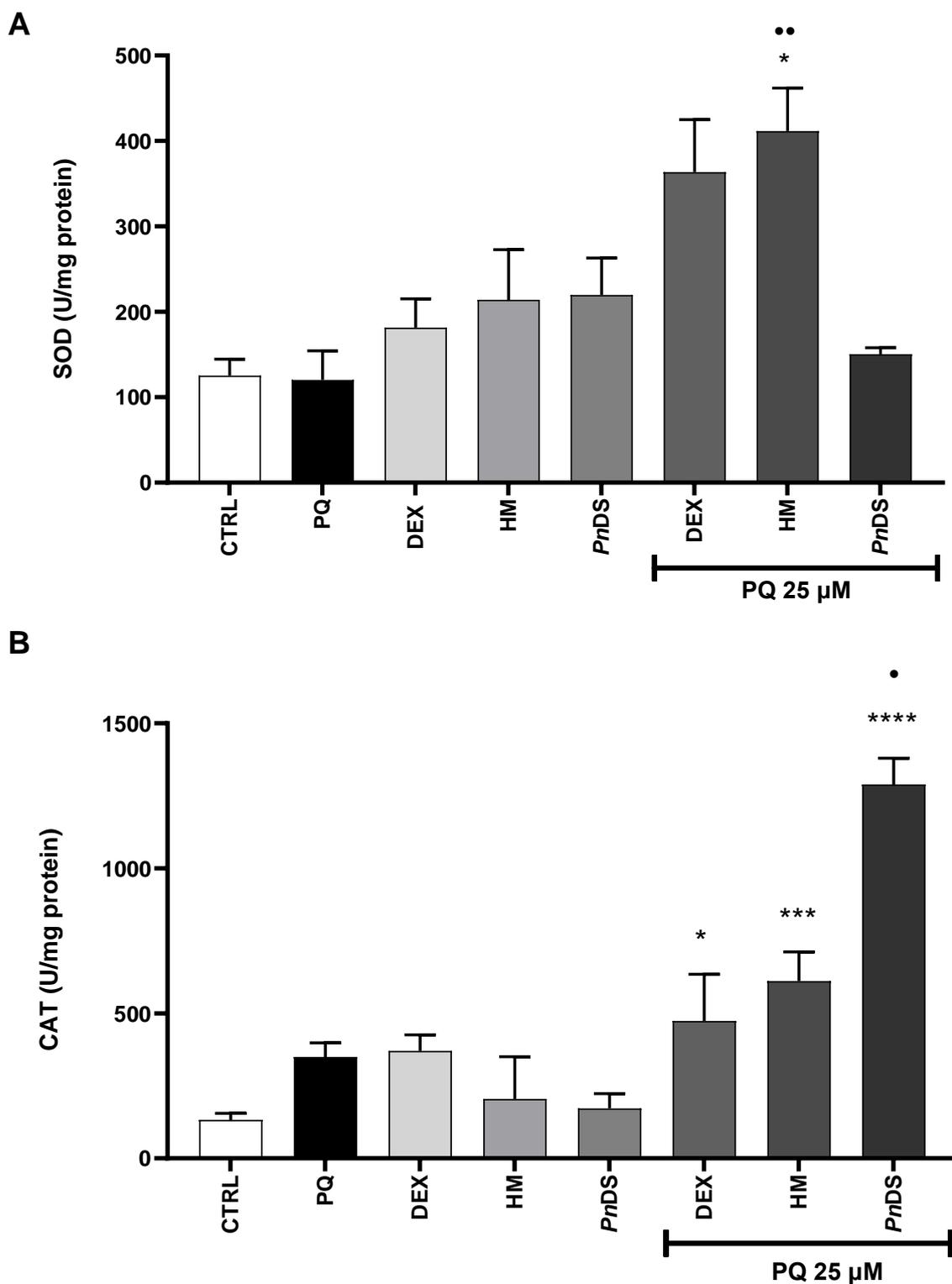
Além do papel do DS de *P. nigra* na viabilidade mitocondrial e na morfologia celular, foi investigado se o efeito neuroprotetor observado nos experimentos realizados aqui estava correlacionado ao efeito antioxidante do *PnDS*, uma vez que o PQ é descrito como indutor de estresse oxidativo.

Para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes e estimar o estresse oxidativo, foi realizada a análise quantitativa de SOD e CAT após 12 horas de incubação com os diferentes tratamentos. Todos esses resultados foram normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra.

As células têm uma variedade de mecanismos de defesa para amenizar os efeitos nocivos das ROS. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão de dois ânions superóxido em uma molécula de peróxido de hidrogênio e oxigênio. A atividade da SOD teve um aumento significativo após 12 horas no tratamento HM co-incubado com PQ, de  $(411,5 \pm 50,38 \text{ U/mg proteína})$ , quando comparada ao controle  $(125,3 \pm 19,11 \text{ U/mg proteína})$  e à PQ  $(125,3 \pm 33,9 \text{ U/mg proteína})$ . Interessantemente, o grupo *PnDS* + PQ não se comportou como os outros tratamentos co-incubados com PQ, demonstrando uma baixa atividade de SOD, de  $(150,4 \pm 7,64 \text{ U/mg proteína})$ , similar ao controle (Figura 22 A).

Nos peroxissomos das células eucarióticas, a enzima CAT converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e, assim, completa a desintoxicação iniciada pela SOD. Após 12 horas, a atividade da enzima catalase teve um aumento significativo no grupo DEX + PQ  $(463,7 \pm 53,74 \text{ U/mg proteína})$  e HM+ PQ  $(610,9 \pm 33,72 \text{ U/mg proteína})$  quando comparado com o controle  $(132,4 \pm 22,77 \text{ U/mg proteína})$ .

Já o grupo que teve o maior aumento da concentração da catalase comparada ao controle e ao PQ  $(349,7 \pm 31,9 \text{ U/mg proteína})$  foi o tratamento de *PnDS* co-incubado com PQ (Figura 22 B).



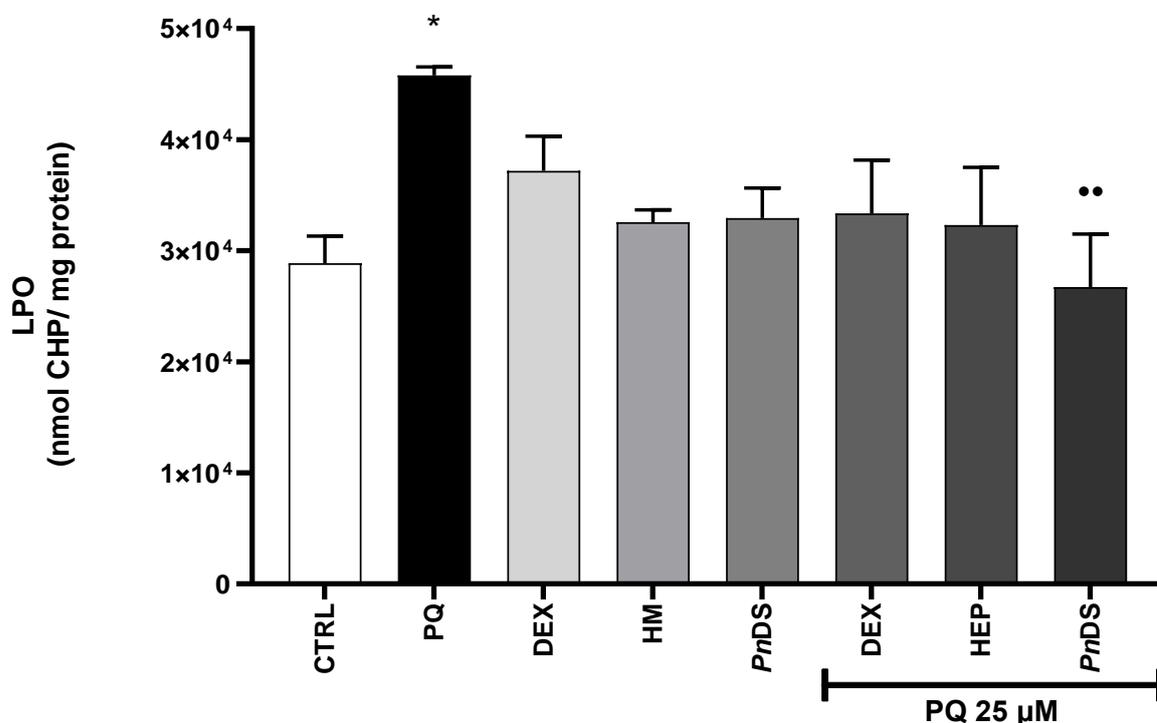
**Figura 22: Atividade enzimática antioxidante nos diferentes tratamentos em BV-2.** A atividade da enzima SOD e CAT foi analisada através do método de oxidação de adrenalina e depleção de  $H_2O_2$ , respectivamente ( $n = 4$ /cada grupo experimental). (A) Atividade de SOD (U/mg de proteína) após 12h horas. Houve um aumento significativo da ação de SOD em 12h no tratamento PQ+HM. (B) Atividade da catalase (U/mg de proteína) após 12h. Houve um aumento significativo da ação da CAT no grupo PnDS co-incubado com PQ no tempo de 12h. A distribuição normal foi verificada pelo teste de D'Agostino & Pearson. Em seguida, utilizou-se o teste paramétrico One-way ANOVA para comparação de mais de dois grupos seguido do-pós teste de Kruskal-Wallis. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*\*\*\*) ( $p \leq 0,0001$ ) e ao grupo Paraquat (\*) ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.6. Diminuição da peroxidação lipídica no grupo *PnDS* co-incubado com o PQ em BV-2

A integridade das membranas celulares foi avaliada pelo ensaio de LPO. A incubação com PQ levou à uma elevada peroxidação lipídica, em comparação com o grupo controle, como esperado. Os níveis de LPO no controle foram de ( $2,8 \times 10^4$  nmol CHP/ mg proteína  $\pm 0,24$ ) e no grupo PQ 25  $\mu$ M foi de ( $4,5 \times 10^4$  nmol CHP/ mg proteína  $\pm 0,07$ ).

Não houve diferença estatística entre os grupos com os tratamentos e o controle ou o PQ, com exceção da co-incubação de PQ com *PnDS*. O *PnDS* co-incubado com o PQ reduziu significativamente os níveis de LPO para ( $2,7 \times 10^4$  nmol CHP/ mg proteína  $\pm 0,48$ ) (Figura 23).

Portanto, houve uma redução da peroxidação de lipídios no grupo PQ + *PnDS* comparativamente ao grupo PQ isolado após 12 horas de tratamento, ou seja, mais uma vez o tratamento com *PnDS* co-incubado com PQ gerou um efeito neuroprotetor.



**Figura 23: Peroxidação lipídica nos diferentes tratamentos celulares.** A peroxidação lipídica foi averiguada através do método de FOX ( $n = 4$ /cada grupo experimental). Os valores foram expressos em CHP (nmol) e normalizados pela proteína (média  $\pm$  SEM). A análise revelou uma diminuição significativa da peroxidação lipídica no grupo *PnDS* co-incubado com PQ no tempo de 12h. A distribuição normal foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, utilizou-se o teste paramétrico One-way ANOVA para comparação de mais de dois grupos seguido do pós-teste de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*) ( $p \leq 0,05$ ) e ao grupo PQ (\*\*) ( $p \leq 0,01$ ).

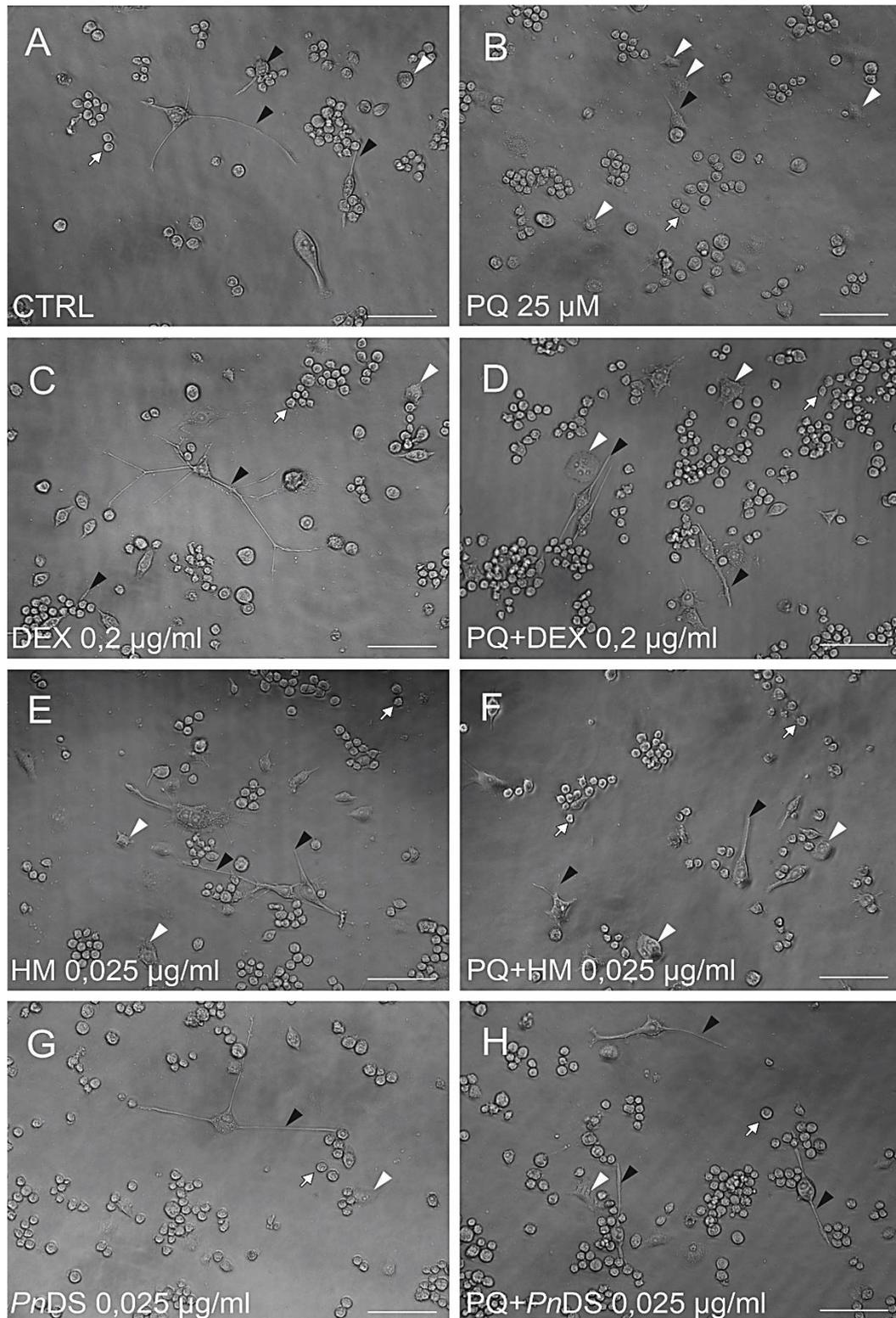
## **5.7. Mudanças morfológicas e restauração da morfologia homeostática microglial promovida pelo PnDS co-incubado com o PQ em BV-2**

Geralmente, os microgliócitos tem uma forma homeostática basal ramificada e, uma vez ativadas, as células se convertem rapidamente em formas arredondadas ou ameboides (DANG *et al.*, 2014).

Com a finalidade de avaliar as mudanças morfológicas e os tipos morfológicos microglias nas células BV-2 incubadas com PQ e com os diferentes tratamentos 12 horas após tratamento, foi feita uma microscopia de contraste de fase e foram avaliadas as células em cada uma fotos (Figura 14). Não houve mudança na quantidade de células por poço. De maneira qualitativa, foram verificados três morfotipos celulares: ramificados, ameboides e arredondados, como proposto por Dang e colaboradores (2014). Todos os grupos apresentaram as células arredondadas de forma igualitária e majoritariamente. Por outro lado, foi possível notar uma diferença na proporção entre ramificadas e ameboides em cada grupo (Figura 24).

No grupo controle, além das arredondadas, havia células ramificadas e pouquíssimas ameboides (Figura 24 A). Já essa proporção era inversa no grupo PQ 25  $\mu\text{M}$ , onde a grande maioria eram células arredondadas e com bastante ameboides e poucas ramificadas (Figura 24 B). Nos grupos apenas com os tratamentos, não foi perceptível uma diferença entre as proporções numéricas de células ramificadas versus ameboides (Figura 24 C, E e G). Porém, vale apontar que as células ramificadas do grupo DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$  apresentava grandes prolongamentos (Figura 24 C).

Nas células com os tratamentos e com a co-incubação com o PQ, diferentemente do grupo PQ 25  $\mu\text{M}$ , houve o reaparecimento de células com ramificações, contudo ainda eram perceptíveis células ameboides (Figura 24 D, F e H).

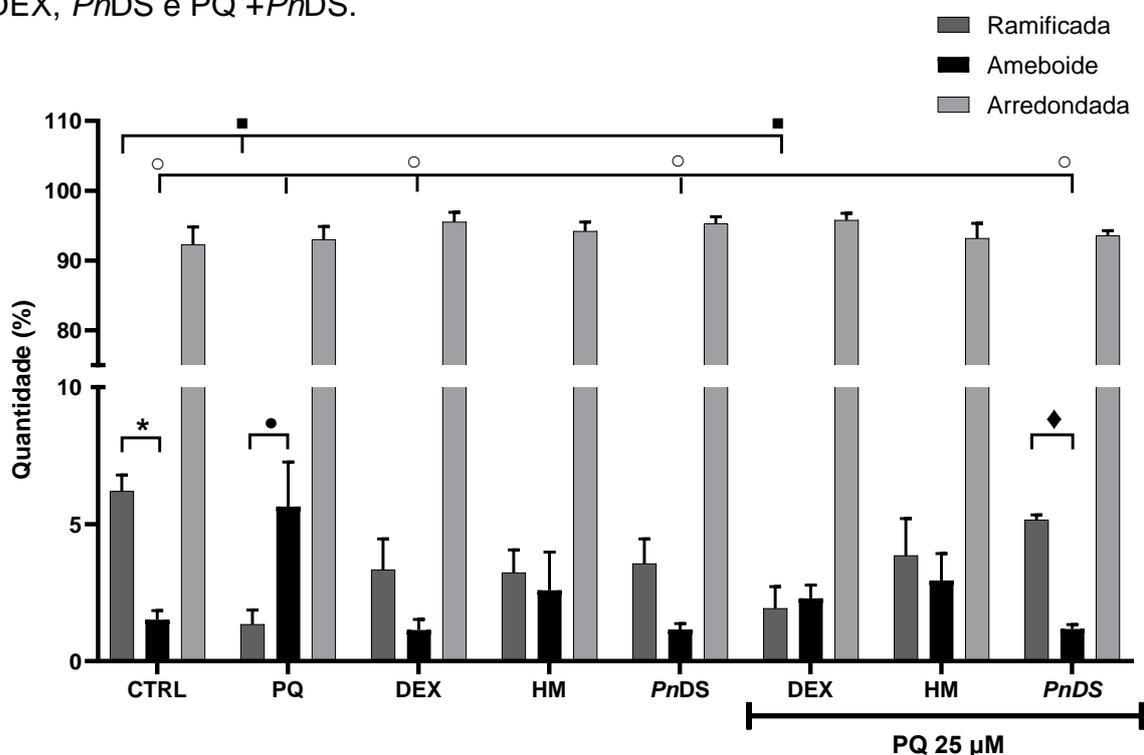


**Figura 24: Avaliação da morfologia celular dos grupos com diferentes tratamentos por microscopia de contraste de fase.** Cabeça de seta pretas indicam prolongamentos celulares. As cabeças de seta brancas indicam células ameboides e as setas brancas indicam células arredondadas. A: controle sem tratamento mostrando células com grandes extensões, morfologia característica de microglíocito não ativado. B: células tratadas com PQ (25 µM) com aparência amebóide com muitas pequenas extensões, característica do microglíocito ativado. C: células tratadas com dexametasona, D: com heparina de mamífero e E: com dermatam sulfato de *Phallusia nigra*, todas apresentando células com extensões grandes e ramificadas. F: paraquat mais dexametasona, G: PQ mais heparina de mamífero e H: PQ mais *PnDS*. Concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. Barra de escala: 100 µm.

Para confirmar os dados qualitativos observados nas fotos da microscopia de contraste de fase foi realizada a quantificação de células para cada morfotipo microglial em cada tratamento (Figura 25).

Como dito anteriormente, as células arredondadas eram mais numerosas e corresponderam à aproximadamente 94% dos morfotipos celulares em todos os grupos. Com relação os outros tipos celulares, o grupo PQ 25  $\mu$ M foi o que teve a maior quantidade de células ameboides (5,6%  $\pm$  1,6%) quando comparadas às ramificadas (1,3%  $\pm$  0,5%). Todos os outros grupos tiveram uma maior proporção de células ramificadas *versus* ameboides. Especialmente no controle, ramificada (6,2%  $\pm$  0,5%) e ameboide (1,5%  $\pm$  0,3%), e no grupo *PnDS*+PQ, ramificada (5,2%  $\pm$  0,2%) e ameboide (1,2%  $\pm$  0,7%), que tiveram diferença significativa entre esses morfotipos.

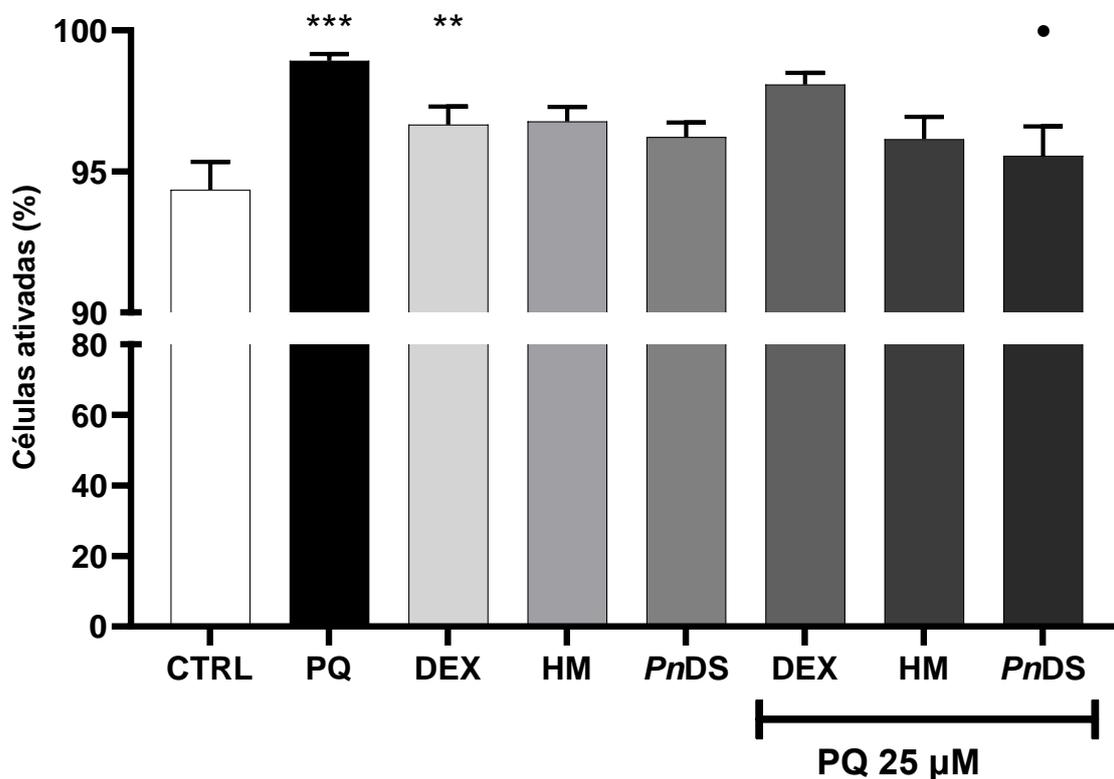
Comparando os morfotipos entre os diferentes tratamentos, obteve-se um número menor de células ramificadas no PQ e PQ+DEX em relação ao controle. Em relação às células ameboides houve um aumento no grupo PQ em relação ao controle, DEX, *PnDS* e PQ +*PnDS*.



**Figura 25: Quantificação dos três tipos morfológicos microgliais nos diferentes tratamentos em BV-2.** A morfologia celular (ramificada, ameboide e arredondada) foi quantificada por microscopia de contraste de fase. O resultado foi obtido no tempo de 12 horas após o tratamento (n = 4 experimentos independentes em triplicata) utilizando o programa NIH ImageJ, versão 1.53e. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. A distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Em seguida, utilizou-se o teste de One-way ANOVA comparação de mais de dois grupos, seguido do teste post hoc de Tukey. Diferença estatisticamente significativa entre células ramificadas e ameboides dentro do grupo controle (\*), Paraquat (•) e *PnDS* (♦). Diferença estatisticamente significativa de células ramificadas em relação ao controle (■), de células ameboides em relação ao Paraquat (○). Todas as diferenças estatísticas são de  $p \leq 0,05$ .

Por fim, foram avaliadas as células ativadas. De acordo com Dang e colaboradores (2014), uma vez ativadas os microgliócitos rapidamente mudam a sua conformação para formas arredondadas ou ameboides. Portanto, foi feita a soma do número de células ameboides mais arredondadas por grupo (Figura 26).

Apesar de resultados semelhantes por conta da grande quantidade de células arredondadas em todo os grupos, verificou-se algumas diferenças estatísticas. O grupo PQ (98,9% ± 0,24%) e o tratamento com DEX (96,6% ± 0,64%) causaram um aumento no número de células ativadas em relação ao controle (94,3% ± 1%). Contudo, mesmo co-incubado com o PQ, o grupo *PnDS* + PQ teve uma redução significativa comparada ao PQ na porcentagem de células ativadas de (95,5% ± 1,04%). Tais resultados apontam o potencial do *PnDS* na manutenção da homeostase morfológica microglial frente a um agente estressor.



**Figura 26: Quantificação do fenótipo morfológico ativado nos diferentes tratamentos em BV-2.** As células ativadas (ameboide + arredondadas) foram quantificadas por microscopia de contraste de fase. O resultado foi obtido no tempo de 12 horas após o tratamento (n = 4 experimentos Independentes em triplicata) utilizando o programa NIH ImageJ, versão 1.53e. As barras representam as médias das triplicatas das análises, com seus respectivos desvios padrões. A distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Em seguida, utilizou-se o teste de One-way ANOVA, seguido do teste post hoc de Tukey. Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (\*), ao grupo PQ (•) e a *PnDS* (•) ( $p \leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os processos celulares envolvidos na neurodegeneração e neuroproteção são um importante campo de estudo nas neurociências e o entendimento de seus mecanismos pode propiciar o desenvolvimento de terapias para o tratamento de DNs.

As DNs são, geralmente, caracterizadas pela morte neuronal causada por uma inflamação com origem multifatorial. A disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo, as mudanças morfológicas celulares e a ativação crônica de células microgliais são tidos como personagens centrais no desbalanço da homeostase do sistema nervoso (SANDERS e GREENAMYRE, 2013). Estudos sugerem que a exposição a toxinas ambientais, tais como pesticidas, podem ser fatores de risco subjacentes ao desenvolvimento de muitas DNs (ASCHERIO *et al.*, 2006; TANNER *et al.*, 2011).

O PQ é um importante membro da família dos bupiridílios de amplo espectro, um herbicida não seletivo de ação rápida que interrompe o sistema intracelular de transferência de elétrons nas plantas, resultando na ruptura das organelas vegetais e, finalmente, levando à morte celular (TSAI, 2013). É amplamente utilizado em todo o mundo em muitos ambientes agrícolas e não agrícolas para controlar ervas daninhas e gramíneas. Relatou-se que o PQ causa envenenamento agudo e morte devido à sua toxicidade. As vias comuns de exposição ao PQ que levariam ao envenenamento, acidental ou intencionalmente, são ingestão, exposição cutânea e inalação (DINIS-OLIVEIA *et al.*, 2008).

No sistema nervoso, o PQ induz alterações tanto a nível celular quanto molecular. See e colaboradores (2022), em sua revisão, apresentaram que o PQ é um forte indutor de estresse oxidativo, o que contribui para a formação de ROS, gera disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica, alteração no metabolismo de dopamina, diminuição de fator neurotrófico, resultando em apoptose dos neurônios dopaminérgicos. Além disso, induz a agregação da  $\alpha$ -sinucleína, característica associada à patologia da DP. A produção de ROS e RNS, como  $O_2^{\bullet-}$  e  $ONOO^-$  por meio da ciclagem redox do PQ, é amplamente proposta como o principal mecanismo do estresse oxidativo, resultando na apoptose de neurônios dopaminérgicos. Assim, a utilização de modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando PQ, exacerbando o estresse oxidativo, pode fornecer um quadro mais amplo para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos em um futuro próximo (SEE, NAIDU e TANG, 2022).

Estudos recentes têm elucidado as propriedades dos GAGs no sistema nervoso, como por exemplo sua ação anticoagulante e anti-inflamatória em diferentes

modelos de estudo. A grande heterogeneidade estrutural dos GAGs pode afetar suas afinidades de se ligarem a proteínas, fazendo assim, com que estas moléculas possam promover efeitos biológicos e por sua vez, exibir potenciais biotecnológicos (SUGAHARA *et al.*, 2003; PAVÃO *et al.*, 2013).

No estudo conduzido por Sousa e colaboradores (2020) utilizou-se o *PnDS* em linhagem celular de neurônio, e foram demonstradas as propriedades biológicas neuroprotetoras que favorecem seu uso como potentes candidatos no tratamento das DNs. Portanto, a composição estrutural peculiar do *PnDS*, aponta esta molécula como um notável alvo biotecnológico com perspectivas de aplicações a serem exploradas (SOUSA *et al.*, 2020).

No presente estudo foram investigados os efeitos neuroprotetores e antioxidantes do *PnDS*, comparado com dois outros fármacos com ação anti-inflamatória descrita, o corticosteroide DEX e o GAG HM, usando uma linhagem de células de microglíocitos BV-2 co-incubados com o pesticida PQ.

A avaliação da atividade mitocondrial pelo teste do MTT nas células BV-2 expostas à diferentes concentrações de PQ demonstrou um efeito citotóxico dose dependente deste, sendo a concentração de 25  $\mu\text{M}$  correspondente à dose de EC<sub>25</sub> (Figura 16). A toxicidade deste agente também ocasionou alterações morfológicas celulares (Figura 17). As células tratadas com PQ nas maiores concentrações (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ ) apresentaram formação de corpos apoptóticos, nas concentrações medianas de PQ (12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ ) observou-se o aparecimento de células ameboides, caracterizadas pelo corpo celular arredondado e com pequenas e numerosas projeções citoplasmáticas, indicando microglíocitos ativados. Já nas menores concentrações de PQ (3,125  $\mu\text{M}$  e 6,25  $\mu\text{M}$ ) a proporção de células com o padrão fenotípico ramificadas foi parecido com o grupo controle, não tratado com este pesticida. A morfologia ramificada indica células em homeostase basal (Figura16).

No teste de MTT com os diferentes tratamentos, não houve diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular. Contudo, nos tratamentos de DEX 0,2  $\mu\text{g/ml}$  e HM 0,025  $\mu\text{g/ml}$  co-incubados com PQ 25  $\mu\text{M}$  foi observada uma redução significativa na atividade mitocondrial. Por outro lado, *PnDS* + PQ, que não teve redução significativa da atividade mitocondrial e sim um aumento significativo comparado ao grupo PQ. Indicando que o *PnDS* restaurou a atividade mitocondrial nas células co-incubadas com PQ enquanto a DEX e a HM não obtiveram a mesma

eficácia (Figura 21). Ou seja, o *PnDs* protege ou restaura as células do dano de PQ e tem efeito superior aos tratamentos controles (DEX e HM).

Uma das principais conclusões feitas pelo estudo de Maher (2021) é que a atividade mitocondrial é necessária para uma resposta imune completa nas células microgлияis. Vários estudos mostraram que a indução de inflamação nas células do microgliócito por LPS ou moléculas relacionadas afeta o metabolismo mitocondrial dos microgliócitos. No estudo conduzido por Maher, foi sugerido que o efeito pró-inflamatório da disfunção mitocondrial também pode contribuir para a exacerbação da neuroinflamação no contexto da DP, uma vez que tanto a rotenona quanto o PQ aumentaram significativamente os marcadores de neuroinflamação em baixas concentrações nanomolares, também utilizando a concentração de PQ 25  $\mu$ M, e ambas as toxinas estão associadas à DP. Portanto, é proposto que alterações na função mitocondrial sinergizam com estímulos inflamatórios para produzir uma resposta pró-inflamatória mais robusta.

Relacionando a DEX ao sistema nervoso, os glicocorticoides induzem morfologia mitocondrial anormal e desregulam a fusão e fissão. Além disso, o tráfego mitocondrial é interrompido por glicocorticoides e as mitocôndrias disfuncionais são subsequentemente acumuladas. Segundo Choi e Han (2021), essas alterações levam à deficiência de energia, principalmente para a transmissão sináptica que requer grandes quantidades de energia. Os glicocorticoides também prejudicam a depuração mitocondrial, impedindo a mitofagia de organelas danificadas e suprimindo a biogênese mitocondrial, resultando na redução do número de mitocôndrias saudáveis. A falha em manter o controle de qualidade mitocondrial degrada a função cerebral e contribui para DNs, incluindo DA, DP e doença de Huntington (CHOI e HAN, 2021).

Foi relatado que o peptídeo amiloide da DA eleva os níveis de PGHS, outro GAG cuja composição química é muito similar com a molécula de heparina (LINDAHL, 1977), porém com menor grau de sulfatação e maior quantidade de ácido D-glucurônico específicos da superfície celular do microgliócito (O'CALLAGHAN *et al.*, 2008).

De acordo com o estudo de O'Callaghan e colaboradores (2014), é concebível que a indução amiloide dos PGHS no microgliócito aumentaria um fenótipo pró-inflamatório e sustentaria um estado inflamatório no cérebro doente. Em seu trabalho destacou-se a capacidade da heparanase em atenuar estados inflamatórios

relevantes para o SNC por meio de sua capacidade de fragmentar os PGHS microgliais.

Os resultados do ensaio de MTT, que mede a atividade mitocondrial relacionando-a com a viabilidade celular, complementam os resultados observados pelo ensaio de H<sub>2</sub>DCFDA que mede a produção de ROS intracelular. Assim, como nos resultados do MTT de todos os tratamentos, no H<sub>2</sub>DCFDA foi observada um alta produção de ROS intracelular no grupo incubado apenas com PQ após doze horas. E todas as co-incubações tiveram grande diferença estatística para menos comparada ao PQ 25 µM. Indicando que os tratamentos mesmo com a co-incubação com PQ reduziram a produção de ROS intracelular (Figura 20).

No grupo controle foi observada uma produção basal de ROS, já que a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias é a principal fonte de ATP celular. Como subproduto, esse processo produz radicais livres ou ROS, espécies reativas de nitrogênio (RNS) e radicais centrados em carbono e enxofre (PERO *et al.*, 1990). Em concentrações fisiológicas, as ROS são mensageiros secundários vitais em múltiplos processos celulares, incluindo inflamação, crescimento celular e diferenciação (ZHANG *et al.*, 2020). O ROS contribui para a ativação imune no cérebro como mensageiros secundários. Múltiplas vias de sinalização importantes contribuem para a ativação imune do microglíocito, incluindo NFκB e há evidências de que o ROS é um importante modulador da resposta imune ao influenciar essas vias de sinalização celular no microglíocito (SIMPSON e OLIVER, 2020).

O estresse oxidativo pode ser concebido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, como SOD e catalase, que são catalisadores ativos de radicais livres, como superóxido e peróxido de hidrogênio. No entanto, o aumento da produção de ROS juntamente com um mecanismo de defesa antioxidante deficiente leva a dano celular progressivo e disfunção fisiológica (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).

Muitas proteínas antioxidantes funcionam no SNC, incluindo antioxidantes clássicos (superóxido dismutase, glutathione redutase, catalase) e mais recentemente proteínas TBC, LysM, domínio catalítico (TLDC). De acordo com Simpson e Oliver (2020), a função desses reguladores redox nos microglíocitos ainda não está clara, no entanto, muitas dessas proteínas estão ligadas à inflamação, sugerindo funcionalidade no microglíocito.

Podemos relacionar os resultados obtidos pelo ensaio de ROS com resultados dos experimentos das enzimas antioxidantes SOD e CAT 12 horas após os

tratamentos. Assim como havia uma produção basal de ROS no controle, também há uma baixa, porém existente, ação de SOD e CAT nesse grupo. O PQ sozinho não elevou a ação dessas enzimas, demonstrando a ineficiência dessa maquinaria em compensar a produção excessiva de ROS causada pela ação cíclica redox do PQ nas células. Os grupos co-incubados com PQ e DEX ou HM demonstraram uma alta atividade de SOD. E uma ação significativamente mais elevada em relação ao controle da CAT. Curiosamente, o grupo *PnDS* co-incubado com PQ não se comportou como os outros tratamentos, apesar de as células desse grupo também produzirem pouco ROS intracelular. A ação da SOD no grupo *PnDS* co-incubado com PQ é quase próxima da ação basal do controle. Porém quando se leva em consideração a CAT, sua ação é altíssima (Figura 22).

Uma hipótese para essa questão é que poderia ter um aspecto temporal envolvido, já que as células têm uma variedade de mecanismos de defesa para amenizar os efeitos nocivos das ROS. A SOD catalisa a conversão de dois ânions superóxidos em uma molécula de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). Nos peroxissomos das células eucarióticas, a enzima catalase converte  $H_2O_2$  em água e oxigênio, completando assim a desintoxicação iniciada pela SOD (MCCORD e FRIDOVICH, 1968). Portanto, o tratamento com *PnDS*, pode ter acelerado essas reações de metabolização dos ânions superóxidos para  $H_2O_2$  pela SOD entregando o peróxido de hidrogênio para a ação final de detoxificação pela CAT.

Por outro lado, existem vários antioxidantes de moléculas pequenas não enzimáticos que desempenham um papel na desintoxicação. A glutathiona pode ser a defesa intracelular mais importante contra os efeitos deletérios das ROS. Este tripeptídeo (glutamil-cisteinil-glicina) fornece um grupo sulfidril exposto, que serve como um alvo abundante para o ataque. As reações com moléculas ROS oxidam a glutathiona, mas a forma reduzida é regenerada em um redox por uma redutase dependente de NADPH. Ela existe em quantidades relativamente grandes e serve para desintoxicar peróxidos e regenerar vários antioxidantes importantes (TARPLEY, WINK, e GRISHAM, 2004).

Sendo assim, estudos futuros ainda serão necessários para elucidar o mecanismo antioxidante relacionado com a ação distinta dessa maquinaria na co-incubação de PQ com o *PnDS*, já que a glutathiona é o mecanismo de defesa oxidante não enzimático mais significativo e este também pode estar envolvido com a baixa função da SOD as 12 horas.

Nas DNs, ocorrem alterações no meio extracelular, variando o conteúdo de GAG e conseqüentemente aumentando o estresse oxidativo. Diferentes mecanismos foram atribuídos ao papel antioxidante dos GAGs. De fato, poucas informações podem ser encontradas na literatura sobre isso. Os diferentes mecanismos podem ser: propriedades iônicas quelantes dos GAGs; interação direta com ROS, incluindo ânions superóxido através de GAGs ligados a SOD extracelular; a rede pericelular, especialmente no SNC, interferindo na difusão de moléculas potencialmente nocivas e mediando vias de transdução de sinal intracelular ligadas a receptores e para endocitose de GAGs (EMERIT, EDEAS e BRICAIRE, 2004; SOLEMAN *et al.*, 2013). A SOD extracelular tem um domínio de ligação à heparina/heparan sulfato (ADACHI, T. *et al.*, 1992) e talvez esta afinidade molecular pode ser o mecanismo que pode ter atuado no aumento da ação da SOD no grupo HM co-incubado com PQ em 12 horas (Figura 22 A).

Em um trabalho publicado pelo nosso grupo, Sousa e colaboradores (2020), observaram uma melhor na atividade da CAT em neurônios Neuro-2A tratadas com *PnDS* co-incubadas com o pesticida rotenona em 72 horas. Isso pode levar à transdução de sinais e ativação da sinalização celular intracelular. O GAG CS [IdoA-GalNAc(4S,6S)] foi descrito como proteína quinase C ativadora, que fosforila Akt, que por sua vez foi descrito como um forte ligante e ativador da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. A sinalização Wnt controla vários eventos biológicos, incluindo processos de desenvolvimento, renovação de tecidos e regeneração. Apesar do trabalho de Sousa e colaboradores (2020) não ter investigado essa via, como CS e DS são análogos, é possível que DS aja por meio da via Akt para desempenhar um papel antioxidante, aumentando a atividade de CAT.

A peroxidação lipídica também está ligada ao estresse oxidativo, sendo relatado o aumento de vários marcadores da peroxidação lipídica no cérebro de pacientes com DP (DEXTER *et al.*, 1989). ROS/RNS resultam em morte celular via peroxidação lipídica (LPO) e oxidação de ácidos nucléicos e proteínas. O estresse oxidativo leve causa apoptose ativando fatores de transcrição nuclear como o NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, fatores incluindo antioxidantes que inibem o NF- $\kappa$ B também suprimem a apoptose subsequente. O GAG ácido hialurônico é relatado por bloquear LPO e suprimir a atividade de NF- $\kappa$ B e caspases, e assim atenuar a apoptose (CAMPO *et al.* 2008). Análogos de heparina também foram relatados por suprimir NF- $\kappa$ B (BELMIRO *et al.* 2009). GAGs incluindo HS e CS reduzem os níveis de LPO e ROS

intracelulares, inibem a liberação de citocromo-c e a ativação de caspases-9 e -3 e bloqueiam a ativação de NF-kB (CAMPO *et al.* 2008 e YUE *et al.* 2009).

Dos resultados encontrados sobre a peroxidação lipídica, primeiramente houve um aumento significativo de LPO no grupo PQ sozinho, como era esperado, já que este aumenta o estresse oxidativo e inibe a ação correta da maquinaria antioxidante celular. Outro destaque nesse resultado é que houve uma redução significativa da peroxidação de lipídios no grupo PQ + *PnDS* comparativamente ao grupo PQ isolado após 12 horas de tratamento, ou seja, mais uma vez houve efeito oposto entre ambos, um efeito neuroprotetor. Pode-se explicar essa diminuição de LPO por conta do aumento da ação antioxidante, especialmente da CAT, o que leva a redução de ROS intracelular em 12 horas, promovida pelo tratamento com *PnDS* (Figura 22).

Após os parâmetros bioquímicos ligados a ação antioxidante do *PnDS* serem estudados, faz-se necessário investigar a morfologia dos microgliócitos, visto que distúrbios na morfologia basal dessas células leva ao seu mal funcionamento, problemas na fagocitose e inflamação.

Em um cérebro saudável, o microgliócito quiescente em repouso exibe uma morfologia ramificada, com prolongamentos citoplasmáticos relativamente longos, um corpo celular estável e pouco ou nenhum movimento. Essa célula quiescente estende seus processos celulares pelo microambiente circundante (NIMMERJAHN *et al.* 2005). Esse estágio de repouso é parcialmente mantido por sinais transmitidos por fatores neuronais e derivados de astrócitos (NEUMANN *et al.*, 2009; RANSOHOFF e CARDONA, 2010).

Os microgliócitos respondem rapidamente a vários tipos de lesões do sistema nervoso alterando sua morfologia, proliferando e regulando positivamente moléculas de superfície (LAURENZI *et al.*, 2001). Uma vez ativadas, as células se convertem rapidamente em formas arredondadas ou ameboides (DANG *et al.*, 2014).

No presente estudo foram observadas mudanças morfológicas nos microgliócitos BV-2 incubados com os diferentes tratamentos. No grupo controle, além das arredondadas, havia células ramificadas e pouquíssimas ameboides (Figura 24 A). As células arredondadas eram mais numerosas e corresponderam à aproximadamente 94% dentre os morfotipos celulares em todos os tratamentos e co-incubações. Com relação os outros tipos celulares, o grupo PQ 25  $\mu$ M (Figura 24 B) foi o que teve a maior quantidade de células ameboides (5%) quando comparadas às ramificadas (1%). Todos os outros grupos tiveram uma maior proporção de células

ramificadas versus ameboides. Especialmente no controle e no grupo *PnDS* +PQ que tiveram diferença significativa entre esses morfotipos. Vale apontar que as células ramificadas do grupo DEX 0,2 µg/ml apresentava grandes prolongamentos (Figura 24 C) (Figura 25).

É importante chamar a atenção para os grandes prolongamentos celulares que as células tratadas com DEX apresentaram. No estudo conduzido por Park e colaboradores (2019), o tratamento com DEX em microgliócitos primários de rato, mudou a morfologia microglial para uma forma bastante ramificada. Houve o aumento significativo do comprimento do perímetro celular e o número de ramos primários. O número de células do microgliócito por área diminuiu. Além de avaliar a morfologia celular, o trabalho de Park e colaboradores (2019) também avaliou marcadores celulares ligados à inflamação e chegaram à conclusão de que a exposição à DEX induziu alterações morfológicas e disfunção nos microgliócitos primários em cultura. Além disso, o microgliócito tratado com DEX mostrou uma redução da função de fagocitose, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e proliferação celular. O estresse crônico ou o tratamento com DEX como agente anti-inflamatório induziu a disfunção do microgliócito; semelhante fenótipo de senescência e que desempenha um fator agravante na depressão ou outras desordens neurológicas (PARK, 2019). A DEX também promoveu a apoptose de células tronco através da disfunção mitocondrial (MA, *et al.*, 2020).

Comparando os morfotipos entre os diferentes tratamentos, obteve-se diferenças significativas do tipo ramificada e ameboide entre os grupos (Figura 25). Houve o decréscimo significativo com relação ao controle de células ramificadas em PQ e em PQ+DEX. Também aconteceu o decréscimo significativo do tipo celular ameboide com relação ao PQ, em DEX, *PnDS* e, até mesmo em PQ co-incubado com *PnDS*. A capacidade que o *PnDS*, mesmo co-incubado com PQ, teve de manter o número de células ramificadas parecido com o controle e de diminuir o tipo celular ameboide com relação ao PQ, demonstra a sua potencial ação em evitar a ativação microglial. Esse resultado foi corroborado com a avaliação de células ativadas, que consiste na soma das células ameboides e arredondadas (Figura 26). O *PnDS* co-incubado com o PQ, diminuiu significativamente o número de células ativas em comparação com o PQ.

Com relação às células BV-2 ativadas pelos diferentes tratamentos, verificou-se diferenças estatísticas quando somadas os morfotipos de células ameboides e

arredondadas. O grupo PQ (98 %) e o tratamento com DEX sozinha (96%) causaram um aumento no número de células ativadas com relação ao controle (93%). Contudo, mesmo co-incubado com o PQ, o grupo *PnDS* + PQ teve uma redução significativa comparada ao PQ puro na porcentagem de células ativadas, aproximadamente de 95%. Tais resultados apontam o potencial do *PnDS* na manutenção da homeostase morfológica microglial frente a um agente estressor.

Embora a mudança morfológica tenha baixa sensibilidade e especificidade na avaliação das diferentes funções do microgliócito ativada *in vitro*, Chor e colaboradores (2013) sugeriram que o microgliócito exibia quatro fenótipos ativados: M1 classicamente ativado com propriedades citotóxicas; M2a com ativação alternativa e envolvimento no reparo e regeneração; M2b com fenótipo imunorregulador e M2c com fenótipo inativado adquirido. E que a avaliação da morfologia e da ultraestrutura celular, juntamente com marcadores inflamatórios, poderiam propor novas estratégias terapêuticas para desordens neurológicas não apenas suprimindo a ativação microglial.

Vale apontar a diferença das concentrações utilizadas entre os tratamentos com a DEX e os GAGs, heparina e *PnDS*. A menor concentração utilizada de DEX, embasado em outros trabalhos, foi de 0,2 µg/ml, enquanto a menor concentração de ambos os GAGs foi de 0,025 µg/ml. Foi escolhida a mesma concentração de HM e de *PnDS* para comparar suas funções. Mesmo com a concentração 10X menor que a DEX, os GAGs, especialmente o *PnDS*, obtiveram resultados neuroprotetores e antioxidantes. Isso pode ser atribuído a uma estrutura diferente encontrada no *PnDS*.

Para comparar as ações desses dois GAGs, HM e *PnDS*, é importante entender suas estruturas químicas e seus mecanismos celulares de ação. A heparina de mamífero é um GAG altamente sulfatado composto por unidades dissacarídicas contendo um ácido hexurônico (ácido α-L-idurônico ou ácido β-D-glucurônico) ligado 1,4 a α-D-glucosamina. As moléculas de heparina consistem em uma mistura heterogênea de polímeros com suporte principal semelhante, que resulta de variações de sulfatação na D-glucosamina (N-acetilada, N-sulfatada, O-sulfatada em C6 e/ou C3) e no resíduo de ácido urônico (O-sulfatada em C2) (LINDAHL *et al.*, 1989).

A HM suína consiste principalmente no dissacarídeo trissulfatado repetitivo 4-α-Ido2S-1→4-α-GlcNS6S-1. A HM de pulmão bovino tem uma composição dissacarídica quase semelhante. Em contraste, as preparações de HM de intestino bovino são mais heterogêneas e contêm α-glucosamina com variações significativas

de substituição: ~60% são N,6-dissulfatadas, como na HM suína, enquanto ~40% são 6-sulfatadas (AQUINO, *et al.*, 2010). A HM suína, utilizada nesse estudo, apesar de não ter sua estrutura química definida, de acordo com a bibliografia, parece ser trissulfatada, com as sulfatações no ácido idurônico (2S) e duas na glucosamina (NS e 6S). Essa estrutura química se assemelha ao *PnDS*, que também possui um ácido idurônico (2S), porém possui uma galactosamina (6S).

Portanto, por conta da similaridade estrutural, é viável a comparação das funções antioxidantes e neuroprotetoras desses dois GAGs. O *PnDS* demonstrou melhores resultados antioxidantes e neuroprotetores, logo parece que a sua composição química, com a sulfatação no carbono 2 do ácido idurônico e no carbono 6 da galactosamina tem papéis relevantes nesses processos. Apesar do *PnDS* e da HM terem o mesmo padrão de 2 sulfatado no ácido idurônico, o *PnDS* possui uma galactosamina (6S) e a HM, uma glucosamina (NS e 6S). Essas diferenças estruturais na segunda porção desses dois GAGs pode ser a chave para explicar a melhor ação antioxidante e neuroprotetora do *PnDS*.

A HM é dotada de uma potente atividade anticoagulante (THUNBERG *et al.*, 1980). Com base na sua capacidade anticoagulante, a heparina não fracionada isolada de mucosa intestinal suína e bovina tem sido usado clinicamente por décadas. No entanto, o seu uso terapêutico é limitado principalmente por seu poder de efeito hemorrágico, o que implica a necessidade de um monitoramento de perto de pacientes que fazem uso dessa heparina (HIRSH, 1984). A HM também tem baixa biodisponibilidade, requer doses diárias múltiplas e tem efeitos colaterais como trombocitopenia induzida por heparina (HIRSH e RASCHKE, 2004; HIRSH *et al.*, 2004). Para contornar esses problemas, diferentes heparinas de baixo peso molecular são produzidas, usando uma variedade de métodos de degradação, incluindo a despolimerização química e a digestão enzimática (HIRSH e RASCHKE, 2004).

Além de seu efeito anticoagulante, a HM também apresenta efeito anti-inflamatório em vários modelos animais de inflamação. Esse efeito é possivelmente mediado por selectinas de leucócitos. Foi relatado por Stevenson e colaboradores (2005), que a dose de HM necessária para o efeito inibitório nas selectinas é maior do que o necessário para a ação anticoagulante, o que aumenta o risco hemorrágico e torna o uso clínico da HM impraticável para tratar a inflamação.

O risco de contaminação por patógenos é um importante aspecto a ser considerado no uso terapêutico de produtos que se originam de mamíferos. Por

exemplo, a associação de proteínas priônicas de mamíferos com a doença encefalopatia espongiforme transmissível (mal da vaca louca) que restringiu o uso da heparina bovina na Europa, EUA e no Japão. Nesses países, a heparina comercial é obtida exclusivamente de tecidos suínos e o risco de contaminação com uma proteína priônica ou mesmo um vírus ainda é presente (PAVÃO, 2014).

Portanto, de acordo com Pavão e colaboradores (2014), ao considerarmos o mecanismo molecular do efeito anti-inflamatório da HM, seus efeitos colaterais e a possibilidade da contaminação com patógeno, torna relevante a busca por compostos alternativos semelhantes à heparina, obtidos de fontes não mamíferas, possuindo atividades biológicas semelhantes, mas isento de efeitos colaterais indesejados.

A ocorrência de uma relação bem definida entre a posição da sulfatação nos dissacarídeos e a atividade biológica podem ser observados estudando espécies de dermatans sulfatos de ascídias. O *PnDS* é supersulfatado e é composto principalmente por unidade dissacarídicas [ $\alpha$ -L-IdoA(2 SO<sub>4</sub>) -1→3 $\beta$ -D-GalNAc(6 SO<sub>4</sub>)] (PAVÃO *et al.*, 1995). Como um resultado da sulfatação diferente na N-acetilgalactosamina (6- sulfatado em vez de 4-sulfatado), o *PnDS* tem baixa atividade anticoagulante mediada pelo cofator- II de heparina. No geral, esses resultados sugerem fortemente que a ligação dos polímeros de dermatam altamente sulfatados ao cofator II de heparina necessite de um padrão de sulfatação no glicano composta por sequencias enriquecidas de [ $\alpha$ -L-IdoA(2 SO<sub>4</sub>) - 1→3 $\beta$ -D-GalNAc(4SO<sub>4</sub>).

Portando o *PnDs*, por conta do seu padrão de sulfatação 2,6 sulfatado não tem atividade antitrombótica, já que essa necessita da ativação do co-fator de heparina (2,4 sulfatado), contudo tem uma ação interessante no sistema nervoso. No estudo realizado por Hikino e colaboradores (2003), o *PnDS* (2-6 sulfatado) induziu mudanças morfológicas em células neurais significativas promovendo o crescimento de neuritos. Enquanto o DS de outra espécie de ascídia, a *Styela plicata*, com a mesma composição química, porém com o padrão de sulfatação (2-4 sulfatado), apresentou uma fraca atividade de promoção de crescimentos de neuritos. Ambos os dermatans atenuaram drasticamente metástase e infiltração inflamatória em modelo animal (Kozlowski *et al.*,2011) e eles também possuem um efeito antitrombótico dependente de P-selectina. Por tanto, os estudos mencionados evidenciam o potencial terapêutico do *PnDS* para trombose, inflamação, metástase e até para neuroregeneração.

Em geral, os glicanos em invertebrados marinhos ocorrem em altas concentrações nos tecidos, com um alto rendimento de extração (por volta de 0,5%

do peso seco comparada à mucosa intestinal de porco que é de 0,022%) e podem facilmente serem isolados por procedimentos simples similares a aqueles já empregados na preparação da heparina comercial. Além disso, esses organismos marinhos também são fontes de moléculas análogas à heparina, porém com efeitos adversos diminuídos e com ação anti-inflamatória, anti-trombótica, anti-cancerígena e neuro-regeneradora por vezes superiores à heparina comercial (PAVÃO, 2014). Elucidar os mecanismos neuroprotetores induzidos pelo *PnDS*, o qual possui a mesma composição química e o mesmo padrão de sulfatação do que o DS endógeno do sistema nervoso de mamíferos em sítios neurogênicos, é um promissor campo de pesquisa para a elaboração de um agente terapêutico ideal para DNS.

Estudos no campo da glicobiologia trazem novas descobertas sobre os mecanismos de ação dos GAGs, dependendo da sua composição química e padrão de sulfatação, nos sistemas biológicos e essas descobertas terão impactos diretos na área da saúde e socioeconômicos, visto o impacto econômica dessas doenças.

## 7. CONCLUSÃO

Após a realização dos experimentos aqui expostos e da análise dos dados com estes adquiridos, podemos realizar algumas inferências sobre a ação do *PnDS* sobre o efeito neuroprotetor e antioxidante contra a citotoxicidade causada pelo PQ na linhagem celular estudada BV-2 após 12 horas de incubação:

- A dose estressora de PQ ( $EC_{25}$ ) foi de 25  $\mu$ M, resultando em uma redução significativa para 75% da atividade mitocondrial em comparação ao grupo controle;
- O *PnDS* na concentração de 0,025  $\mu$ g/ml co-incubado com PQ restaurou a atividade mitocondrial celular e/ou protegeu as células dos danos mitocondriais;
- A incubação com PQ 25  $\mu$ M gerou uma marcação de 80% para ROS intracelular, indicando o estresse oxidativo causado por este nas células. Em contrapartida, todas as concentrações de DEX, HM e *PnDS* co-incubados com PQ diminuíram estatisticamente e/ou evitaram o aumento da marcação para ROS;
- A ação das enzimas antioxidantes foi modulada pelo *PnDS*, que na concentração de 0,025  $\mu$ g/ml co-incubado com PQ apresentou um aumento da ação da enzima CAT, porém não da SOD, comparado com o controle e com o PQ sozinho, levantando hipóteses que devem ser exploradas em trabalhos futuros;
- O PQ sozinho aumentou a peroxidação lipídica, comparado ao controle, representando seu efeito citotóxico. Enquanto, o *PnDS* na concentração de 0,025  $\mu$ g/ml co-incubado com PQ reduziu significativamente e/ou protegeu as células da peroxidação lipídica, demonstrando seu efeito neuroprotetor;
- O *PnDS* na concentração de 0,025  $\mu$ g/ml co-incubado com PQ apresentou a mesma proporção de células ramificada, ameboides e arredondadas, comparado ao controle e ainda reduziu o número de células ativadas em comparação com o PQ, demonstrando que ele tem capacidade de manter a morfologia homeostática microglial;
- O *PnDS* com padrão 2,6 sulfatado apresentou um melhor potencial neuroprotetor e antioxidante em comparação com a DEX e a HM, mesmo após lesão química induzida por PQ. Indicando que a composição química e a sulfatação no carbono 2 do ácido idurônico e no carbono 6 da galactosamina tem papéis relevantes nesses processos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI T, KODERA T, OHTA H, HAYASHI K, HIRANO K. The heparin binding site of human extracellular-superoxide dismutase. **Arch Biochem Biophys.** 1992;297(1):155-161. doi:10.1016/0003-9861(92)90654-f
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHANGER, I. A., PARRAY, Z. A., NASREEN, K., AHMAD, F., HASSAN, M. I., ISLAM, A., & SHARMA, A. (2021). Heparin Accelerates the Protein Aggregation via the Downhill Polymerization Mechanism: Multi-Spectroscopic Studies to Delineate the Implications on Proteinopathies. **ACS Omega**, 6(3), 2328-2339. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05638>
- AKATSU C, MIZUMOTO S, KANEIWA T, MACCARANA M, MALMSTROM A, YAMADA S, SUGAHARA K, 2011. DS epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/DS hybrid structure in postnatal developing mouse brain. **Glycobiology.** 21:565–574.
- ALLAN SM, ROTHWELL NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci.** 2001 Oct;2(10):734-44. doi: 10.1038/35094583. PMID: 11584311.
- ALZHEIMER, A.; **Neurol. Central.** 1907, 25, 1134.
- AMADO L. L., GARCIA M. L., RAMOS P. B., FREITAS R. F., ZAFALON B., FERREIRA J. L. R., YUNES J. S. AND MONSERRAT J. M. (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment.* 407, 2115-2123.
- AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, n. 2, p. 154-169, 2010.
- AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases—an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151-166, 2014.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R. DE, SOUZA, R. B. DE, SANTOS, S. A. DOS, & ANDRADE, D. R. DE. (2005). Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(1), 60–68. doi:10.1590/s1806-37132005000100011
- AQUINO RS, PEREIRA MS, VAIRO BC, CINELLI LP, SANTOS GR, FONSECA RJ, MOURÃO PA. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: Are they similar drugs? **Thromb Haemost** 2010, 103:1005–1015.
- ASCHERIO A, CHEN H, WEISSKOPF MG, O'REILLY E, MCCULLOUGH ML, CALLE EE, SCHWARZSCHILD MA, THUN MJ. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. **Ann Neurol.** 2006 Aug;60(2):197-203. doi: 10.1002/ana.20904. PMID: 16802290.
- BANDTLOW, C. E., AND ZIMMERMANN, D. R. 2000. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. **Physiol. Rev.** 80, 1267–1290
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BAO X, MURAMATSU T, SUGAHARA K. 2005. Demonstration of the pleiotrophin-binding oligosaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brains. **J Biol Chem.** 280: 35318–35328.

- BARNHAM K.J., MASTERS C.L., BUSH A. I., Neurodegenerative diseases and oxidative stress, **Nat. Rev. Drug Discov.** 3 (3) (2004) 205–214
- BEAL, M. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature reviews neuroscience*, v. 2, n. 5, p. 325-332, 2001.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276 – 287, 1971.
- BELMIRO CL, CASTELO-BRANCO MT, MELIM LM et al. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats. **J Biol Chem.** (2009)
- BEUTLER, E. Disorders in glutathione metabolism. **Life Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1499–1505, 1975.
- BICER YO, KOYBASI S, SUSLU AE, KUKNER A, TEZCAN E, ULAS N. Effect of heparin on inflammation: an animal model of tracheal stents. **Laryngoscope.** 2014;124(9):E368-E372. doi:10.1002/lary.24684
- BIGOLIN, R. C. INTOXICAÇÕES PROVOCADAS PELO HERBICIDA PARAQUAT : ESTUDO DE 219 CASOS. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2004
- BOSE A, BEAL MF. 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **J Neurochem** 139(Suppl 1):216–231
- BOURLAT S.J., JULIUSDOTTIR T., LOWE C.J., FREEMAN R., ARONOWICZ J., KIRSCHNERM., LANDER E.S., THORNDYKE M., NAKANOH., KOHNA.B., HEYLANDA., MOROZL.L., COPLEYR.R., TELFORD M.J.: Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. **Nature.** 444, 85-88. 2006.
- BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BREDESEN, D. E., RAO, R. V., & MEHLEN, P. 2006. Cell death in the nervous system. **Nature**, 443(7113), 796–802.
- BRODKEY, J. et al. The complex nature of interactive neuroregeneration-related molecules. **Experimental neurology**, v. 123, n. 2, p. 251-270, 1993.
- BURNS, A.; Iliffe, S.; **British Med. J.** 2009, 338, b158.
- BUTOVSKY, O., TALPALAR, A.E., BEN-YAAKOV, K., SCHWARTZ, M., 2005. Activation of microglia by aggregated  $\beta$ -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- $\gamma$  and IL-4 render them protective. **Mol. Cell. Neurosci.** 29, 381–393
- CAMPO GM, AVENOSO A, CAMPO S, D'ASCOLA A, TRAINA P, SAMÀ D, CALATRONI A. NF-kB and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress. **J Appl Toxicol.** 2008 May;28(4):509-17. doi: 10.1002/jat.1302. PMID: 17879260.
- CANAS N., VALERO T., VILLARROYA M., MONTELL E., VERGES J., GARCIA A.G., *et al.* Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. **J Pharmacol Exp Ther**, 323 (2007), pp. 946-953
- CÁSSARO C.M., DIETRICH C.P.: Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.** 252, 2254 –2261. 1977.

- CATLOW, K., DEAKIN, J. A., DELEHEDDE, M., FERNIG, D. G., GALLAGHER, J. T., PAVÃO, M. S., AND LYON, M. 2003. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its interaction with heparan sulphate and dermatan sulphate. **Biochem. Soc. Trans.** 31, 352–353
- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.** 1979;59(3):527-605. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.527
- CHANCHAI, S. Paraquat poisoning. *Respiratory Care*, v.50 (3), 2005
- CHHOR *et al.* Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. **Brain Behav Immun** 32:70–85. (2013).
- CHOI, G. E., & HAN, H. J. Glucocorticoid impairs mitochondrial quality control in neurons. **Neurobiology of Disease**, 152, 105301. (2021).
- CHUNG SEE, W. Z., NAIDU, R., & TANG, K. S. (2022). Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. **Molecular Neurobiology**, 59(6), 3353-3369.
- CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 9, p. 475–483, 2009
- CLEMENT, A., NADANAKA, S., MASAYAMA, K., MANDL, C., SUGAHARA, K., AND FAISSNER, A 1998. The DSD-1-epitope depends on sulfatation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. **J. Biol. Chem.** 273, 28444–28453
- CLEMENT, A., SUGAHARA, K., AND FAISSNER, A. 1999. Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. **Neurosci. Lett.** 269, 125–128
- COBLEY JN, FIORELLO ML, BAILEY DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biol.** 2018;15:490-503. doi:10.1016/j.redox.2018.01.008
- COLLE, D., e FARINA, M. Oxidative stress in paraquat-induced damage to nervous tissues. **Toxicology**, 69-78. (2021).
- CUMMINGS, J.L., MORSTORF, T., ZHONG, K., 2014. Alzheimer's Disease Drug-Development Pipeline: Few Candidates, Frequent Failures. *Alzheimers*. **Res. Ther.** 6, 37.
- DANG, Y., XU, Y., WU, W., LI, W., SUN, Y., YANG, J. ZHANG, C. (2014). Tetrandrine Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation by Inhibiting NF-κB and ERK Signaling Pathways in BV2 Cells. *PLoS ONE*, 9(8),
- DEISSEROTH A, DOUNCE AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiol Rev.** 1970;50(3):319-375. doi:10.1152/physrev.1970.50.3.319
- DEXTER DT, CARTER CJ, WELLS FR, JAVOY-AGID F, AGID Y, LEES A, JENNER P, MARSDEN CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **J Neurochem.** 1989 Feb;52(2):381-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb09133.x. PMID: 2911023.
- DINIS-OLIVEIRA *et al.* Herbicida Paraquat: Riscos à saúde e Legislação. **Cetox UFC**. Boletim 12. 2008
- DISCHE Z. 1946. Characteristic and sensitive color reaction of SH-compounds. *Fed Proc.*;5(1 Pt 2):132.
- DUDAS B. e SEMENIKEN K. (2012) Glycosaminoglycans and Neuroprotection. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 325–343.
- DUGGER B. N. e DICKSON D. W. (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 9, (7), a028035.

- DUMONT, M.F. BEAL, Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (5) (2011) 1014–1026.
- DUQUE EDE A, MUNHOZ CD (2016) The pro-inflammatory effects of glucocorticoids in the brain. *Front Endocrinol* (Lausanne) 7:78
- ELBAZ A, CARCAILLON L, KAB S, MOISAN F. 2015. Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue neurologique*. N.13.
- EMERIT J., EDEAS M., BRICAIRE F., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58 (2004) 39–46.
- extracellular matrix in neurological disorders, *Neuroscience*. 253 (2013)
- FAISSNER, A., CLEMENT, A., LOCHTER, A., STREIT, A., SCHUTTE, K., MANDL, C., AND SCHACHNER, M. 1994. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell Biol.* 126, 783–799
- FARNDAL, R.; BUTTLE, D.; BARRETT, A. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986
- FRESHNEY, I. R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley & Sons, Dec 23, 2015. 736p.
- GAMBARINI, A. et al. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 124, n. 2, p. 121-129, 1993.
- GAN, L. et al. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nature neuroscience*, v. 21, n. 10, p. 1300-1309, 2018.
- GILGUN-SHERKI Y, MELAMED E, OFFEN D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 2001 Jun;40(8):959-75. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00019-3. PMID: 11406187.
- GINHOUX F, LIM S, HOEFFEL G, LOW D, HUBER T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 17;7:45. doi: 10.3389/fncel.2013.00045. PMID: 23616747; PMCID: PMC3627983.
- GRUMET, M., FRIEDLANDER, D. R., AND SAKURAI, T. 1996. Function of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: Interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurol.* 3, 319–330
- GUL M, KUTAY FZ, TEMOCIN S, HANNINEN O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol*. 2000;38(7):625-634.
- HANCOCK, J.T., R. DESIKAN, S.J. NEILL, (2001) Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochemical*.
- HARRY, G.; KRAFT, A. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 4, n. 10, p. 1265-1277, 2008.
- HENEKA, M.T., KUMMER, M.P., LATZ, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.

- HEPPNER, F.L., RANSOHOFF, R.M., BECHER, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurosci.** 16, 358–372.
- HERTZMAN, C.M.W; BOWERING, D.; SNOW, B.; DONALD, C. Parkinson's Disease: A Case-control Study of Occupational and Environmental Risk Factors. *American Journal of Industrial Medicine* 17 (3): 349–55, 1990.
- HICKMAN, S.E., ALLISON, E.K., EL KHOURY, J., 2008. Microglial dysfunction and defective – Amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice. **J. Neurosci.** 28, 8354–8360.
- HIGASHI, K. et al. Composition of glycosaminoglycans in elasmobranchs including several deep-sea sharks: identification of chondroitin/dermatan sulfate from the dried fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. *Plos One*, v. 10, n. 3, p. e0120860, 2015
- HIKINO, M., MIKAMI, T., FAISSNER, A., VILELA-SILVA, A. C., PAVÃO, M. S., AND SUGAHARA, K. 2003. Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. **J. Biol. Chem.** 278, 43744–43754
- HIKINO, M., MIKAMI, T., FAISSNER, A., VILELA-SILVA, A. C., PAVÃO, M. S., AND SUGAHARA, K. 2003. Oversulfated dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons: implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. **J. Biol. Chem.** 278, 43744–43754
- HILLS FA, ABRAHAMS VM, GONZÁLEZ-TIMÓN B, FRANCIS J, CLOKE B, HINKSON L, RAI R, MORGAN, REGAN L, SULLIVAN M, LAM EW, BROSENS JJ. Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast. **Mol Hum Reprod.** 2006 Apr;12(4):237-43. doi: 10.1093/molehr/gal026. Epub 2006 Mar 23. PMID: 16556679.
- HIRSH J, RASCHKE R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **Chest.** 2004 Sep;126(3 Suppl):188S-203S. doi: 10.1378/chest.126.3\_suppl.188S. PMID: 15383472.
- HIRSH J. Heparin induced bleeding. **Nouv Rev Fr Hematol** (1978). 1984;26(4):261-6. PMID: 6382162
- HIRT, U. A. AND LEIST, M. (2003). Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. **Cell Death Differ.** 10, 1156-1164
- ISHIKAWA Y. e KITAMURA M. (1999) Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin. *Kidney International.* 56, (3), 954–963.
- IVANCICH, ANABELLA, et al. "EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. **Biochemistry** 36.31 (1997): 9356-9364.
- JACKSON RL, BUSCH SJ, CARDIN AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev.** 1991 Apr;71(2):481-539. doi: 10.1152/physrev.1991.71.2.481. PMID: 2006221.
- JAMAL, et al. Insights into Infusion-Based Targeted Drug Delivery in the Brain: Perspectives, Challenges and Opportunities. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23(6), 3139.
- JEVTIC, Stefan et al. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], p. 84-94, 31 ago. 2017. DOI 10.1016/j.arr.2017.08.005.

- JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
- JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange: Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, n.10, p. 853–856, 1991.
- KARAMANOU, K., ESPINOSA, D. C. R., FORTUNA-COSTA, A., & PAVÃO, M. S. G. (2016). Biological function of unique sulfated glycosaminoglycans in primitive chordates. ***Glycoconjugate Journal***, 34(3), 277–283. doi:10.1007/s10719-016-9728-5
- KIM, Y. Neuroprotective Phenolics in Medicinal Plants. ***Archives of Pharmacol***, 33(10):1611-32. doi: 10.1007/s12272-010-1011-x. Epub, out, 2010.
- KJEUIN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. ***Annual Review of Biochemistry***, 443-475 p., 9110701044, 1991.
- KLEIN, J. A.; ACKERMAN, S. L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 6, p. 785–793, 2003.
- KNAPP LT, KLANN E. (2002) Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? ***J Neurosci Res*** 70:1–7. WANG, Y., LOAKE, G. J., & CHU, C. (2012). Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. ***Frontiers in Plant Science***, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00314>
- KOLSET, S. O.; GALLAGHER, J. T. Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1032, n. 2-3, p. 191-211, 1990. YANG, R. et al. Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulphate A Rapidly Promote Differentiation of Immature DC with Upregulation of Costimulatory and Antigen-Presenting Molecules, and Enhancement of NF-κB and Protein Kinase Activity. *Scandinavian journal of immunology*, v. 55, n. 1, p. 2-13, 2002.
- KONDILATOS, G., *et al.* Occurrence of the first non-indigenous ascidian *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in Greek waters. ***Aquatic Invasions*** 5 (2010): 181-184.
- KÖWITSCH, A. et. al. Medical application of glycosaminoglycans: a review. *Germania, Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, v.12, p. 23-42, 2017.
- KOZLOWSKI E.O., GOMES A.M., SILVA C.S., PEREIRA M.S., DE VILELA SILVAA.C.E.S., PAVÃO M.S.G. Structureandbiologicalactivitiesof glycosaminoglycan analogs from marine invertebrates: new therapeuticagents. ***Glycansindiseasesand therapeutics***, pp. 159–184. Springer, Berlin. 2011.
- KRABBE G, HALLE A, MATYASH V, RINNENTHAL JL, EOM GD, BERNHARDT U, MILLER KR, PROKOP S, KETTENMANN H, HEPPNER FL. Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. ***PLoS One***. 2013;8(4):e60921. doi: 10.1371/journal.pone.0060921. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23577177; PMCID: PMC3620049.
- KRICHEN F, GHLISSI Z, BEN AMOR I, SAYARI N, KALLEL R, GARGOURI J, SAHNOUN Z, BOUDAWARA T, ELLOUZ-CHAABOUNI S, BOUGATEF A. 2018. Glycosaminoglycans from grey triggerfish and smooth hound skins: Rheological, Anti-inflammatory and wound healing properties. *Biomac. International Journal of Biological Macromolecules*; Vol 118, Part A, 15 October, Pages 965-975.

- KRICHEN, F.; GHLISSI, Z.; et al. In vitro and in vivo anti-coagulant activity and toxicological studies of marine sulfated glycosaminoglycans. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2017. v.69, n.1, p.45-53.
- LAMBERG SI, STOOLMILLER AC. Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review. *J Invest Dermatol*. 1974 Dec;63(6):433-49. doi: 10.1111/1523-1747.ep12680346. PMID: 4139221.
- LAURENZI, M. A., ARCURI, C., ROSSI, R., MARCONI, P., & BOCCHINI, V. Neurochemical Research, 26(11), 1209–1216. (2001).
- LÁZARO DF, PAVLOU MAS, OUTEIRO TF. 2017. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 298, 162–171.
- LIN, M.; BEAL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006.
- LINDAHL, U. Biosynthesis of Heparin and Heparan Sulfate. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 82(2), 78–79. (1977).
- LINHARDT RJ, AI-HAKIM A, LIU J, HOPPENSTEADT D, MASCELLANI G, BIANCINI P and FAREED J. 1991. Structural features of dermatan sulfate and their relationship to anticoagulant and antithrombotic activities. *Biochem. Pharm.* 42, (Suppl I) 1609- 1619.
- LIU, H. H.; TSAI, M. C.; CHEN, C. J.; JENG, J. S.; CHANG, Y. C.; CHEN, S. Y., & CHEN, R. C. Environmental risk factors and Parkinson's disease: A case-control study in Taiwan. *Neurology*, 48(6), 1583–1588, 1997
- LIU Y, PETERSON D.A, KIMURA H, SCHUBERT D. 1997. Mechanism of cellular 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.*; 69:581–593.
- LOPES FM, BRISTOT IJ, DA MOTTA LL, PARSONS RB, KLAMT F. 2017. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In vitro Models. *NeuroMolecular Medicine*, 19(2-3), 241–255.
- LUCIN, K.M., O'BRIEN, C.E., BIERI, G., CZIRR, E., MOSHER, K.I., ABBEY, R.J., MASTROENI, D.F., ROGERS, J., SPENCER, B., MASLIAH, E., WYSS-CORAY, T., 2013. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. **Neuron** 79, 873–886.
- LUND, S., CHRISTENSEN, K. V., HEDTJARN, M. *et al.* (2006). the dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. **J. Neuroimmunol.** 180, 71-87.
- LUND, S., PORZGEN, P., MORTENSEN, A. I. *et al.* (2005). Inhibition of microglial inflammation by the MLK inhibitor CEP-1347. **J. Neurochem.** 92, 1439-1451.
- MA, L., FENG, X., WANG, K., SONG, Y., LUO, R. AND YANG, C. Dexamethasone promotes mesenchymal stem cell apoptosis and inhibits osteogenesis by disrupting mitochondrial dynamics. **FEBS Open Bio**, 10: 211-220. (2020)
- MAEDA N, FUKAZAWA N, ISHII M, 2010. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and plasticity. *Front Biosci.* 15:626–644.
- MAHER, P. Investigations into the Role of Metabolism in the Inflammatory Response of BV2 Microglial Cells. **Antioxidants**, 10(1). (2021).

- MARKLUND SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* 1984;74(4):1398-1403. doi:10.1172/JCI111550
- MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 34, n. 2, p. 175, 2013. GWYNNE, D. C.; MURRAY, R.B. *Weed biology and control in agriculture and horticulture.* London Batsford Academic and Educational, 1985.
- MAWUENYEGA, K.G., SIGURDSON, W., OVOD, V., MUNSELL, L., KASTEN, T., MORRIS, J.C., YARASHESKI, K.E., BATEMAN, R.J., 2010. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. **Science** 330, 1774
- MCCORD, J.M. AND I. FRIDOVICH The Reduction of Cytochrome C by Milk Xanthinase Oxidase. **J. Biol. Chem.** (1968)
- MEDEIROS, TAIANE BARRETO. Dermatam sulfato de *Phallusia nigra* e sua ação neuroprotetora, neuritogênica e anti-inflamatória em lesão induzida por rotenona in vitro. **Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.** 2021.
- MEHTA, D. et al. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 26, n. 6, p. 735- 739, 2017.
- MILLER RL, SUN GY, SUN AY. Cytotoxicity of paraquat in microglial cells: Involvement of PKCdelta- and ERK1/2-dependent NADPH oxidase. **Brain Res.** 2007; 1167:129-139. doi: 10.1016/j.brainres.2007.06.046
- MIYAMOTO, K. et al. Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology*, v. 24, n. 5, p. 469-475, 2014.
- MONSERRAT, J. M. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v. 45, n. 2, p. 177-83, 2003.
- MORAWSKI M., BRUCKNER M.K., RIEDERER P., BRUCKNER G., ARENDT T.. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. **Exp Neurol**, 188 (2004), pp. 309-315.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- MRAK RE, GRIFFIN WS. Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.** 2005 Mar;8(4):369-75. doi: 10.3233/jad-2005-8406. PMID: 16556968.
- NADANAKA, S., CLEMENT, A., MASAYAMA, K., FAISSNER, A., AND SUGAHARA, K. 1998. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D which neurite outgrowth promoting activity. **J. Biol. Chem.** 273, 3296–330
- NADER HB, et. al., 1999. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Brazilian journal of Medical and Biological Research.*, v. 32, p. 529-538
- NANDINI, C. D., ITOH, N., AND SUGAHARA, K. 2005. Novel 70-kDa chondroitin sulfato/dermatan sulfato hybrid chains with a unique heterogeneous sulfation pattern from shark skin, which exhibits neuritogenic and binding activities for growth factors and neurotropic factors. **J. Biol. Chem.** 280, 4058–4069
- NAYAK D, ROTH TL, MCGAVERN DB. Microglia development and function. **Annu Rev Immunol.** 2014;32:367-402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240. 2014.

- NEUMANN H, KOTTER MR, FRANKLIN RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**. 2009 Feb;132(Pt 2):288-95. doi: 10.1093/brain/awn109. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18567623; PMCID: PMC2640215
- NIKI E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med**. 2010 Aug 15;49(4):503-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20416370.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., HELMCHEN, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo – resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo – supporting online material. **Science** 308, 1314–1319
- NORGARD-SUMNICHT, K., & VARKI, A. 1995. Endothelial Heparan Sulfate Proteoglycans That Bind to L-Selectin Have Glucosamine Residues with Unsubstituted Amino Groups. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12012–12024.
- O'CALLAGHAN, P., *et al.* Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. **Brain Pathol**. 18, 548–561. (2008)
- O'CALLAGHAN P, NOBORN F, SEHLIN D, LI JP, LANNFELT L, LINDAHL U, ZHANG X. Apolipoprotein E increases cell association of amyloid- $\beta$  40 through heparan sulfate and LRP1 dependent pathways. **Amyloid**. 2014 Jun;21(2):76-87. doi: 10.3109/13506129.2013.879643. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24491019.
- OGAWA K. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. **Antioxid Redox Signal**. 2005 Jul-Aug;7(7-8):973-81. doi: 10.1089/ars.2005.7.973. PMID: 15998252.
- OOHIRA, A., MATSUI, F., TOKITA, Y., YAMAUCHI, S., AND AONO, S. 2000. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. **Arch. Biochem. Biophys**. 374, 24–3
- PALIWAL, R. *et al.* Cell-selective mitochondrial targeting: progress in mitochondrial medicine. *Current drug delivery*, v. 4, n. 3, p. 211-224, 2007.
- PAPY-GARCIA D, MORIN C, HUYNH MB, SIÑERIZ F, SISOEF L, *et al.* 2011. Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration. **Curr Protein Pept Sci** 12: 258–268.
- PARK, MJ., PARK, HS., YOU, MJ. *et al.* Dexamethasone Induces a Specific Form of Ramified Dysfunctional Microglia. **Mol Neurobiol** 56, 1421–1436 (2019).
- PAVAO M.S. 2014. Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. **Front Cell Infect Microbiol**. Sep 10; 4:123.
- PAVÃO, M. S, *et al.* Highly Sulfated Dermatan Sulfates from Ascidians: STRUCTURE VERSUS ANTICOAGULANT ACTIVITY OF THESE GLYCOSAMINOGLYCANS. **Journal of Biological Chemistry**, 273(43), 27848-27857. (1998).
- PAVAO, M.S., MOURAO, P.A., MULLOY, B., TOLLEFSEN, D.M. 1995. A unique dermatan sulfate like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem* 270:31027-31036.
- PAVÃO, S. G. Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 4. (2013).
- PEOPLES, J.N., SARAF, A., GHAZAL, N. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med* 51, 1–13 (2019).

- PERO RW, ROUSH GC, MARKOWITZ MM, MILLER DG. (1990) Oxidative stress, DNA repair, and cancer susceptibility. **Cancer Detect Prev** 14:555–561
- PETERSEN SV, OURY TD, OSTERGAARD L, et al. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. **J Biol Chem.** 2004;279(14):13705-13710. doi:10.1074/jbc.M310217200
- PETROVITCH, H. G.; WEBSTER ROSS, R. D.; ABBOTT, W.T.; SANDERSON, D.S.; SHARP, C.M.; TANNER, K.M. Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-Based Longitudinal Study. *Archives of Neurology* 59 (11): 1787–92, 2002.
- PINHEIRO, I. Intoxicacao por paraquat - revisao bibliografica. Hospital Santa Maria, Lisboa, 2002.
- POMIN V.H. A dilemma in the glycosaminoglycan-based therapy: synthetic or naturally unique molecules? **Med. Res.Rev.**35, 1195– 1219. 2015.
- POPA-WAGNER, S. MITRAN, S. SIVANESAN, E. CHANG, A.M. BUGA, ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 963520
- PRYDZ, K. e DALEN, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of Cell Science* 113, 193–205 (2000).
- RACHMILEWITZ, J.; TYKOCINSKI, M. Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 92, n. 1, p. 223- 229, 1998.
- RANI, A.; BARUAH, R.; GOYAL, A. Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers** , 2017 . v.159, p.11-19.
- RANSOHOFF RM, CARDONA AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature.** 2010 Nov 11;468(7321):253-62. doi: 10.1038/nature09615. PMID: 21068834.
- RANSOHOFF, R. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, v. 353, n. 6301, p. 777-783, 2016
- RICHARDSON, J. R., QUAN, Y., SHERER, T. B., GREENAMYRE, J. T., AND MILLER, G. W. (2005). Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicol. Sci.** 88, 193–201.
- ROLLS, A. et al. A sulfated disaccharide derived from chondroitin sulfate proteoglycan protects against inflammation-associated neurodegeneration. *The FASEB journal*, v. 20, n. 3, p. 547-549, 2006.
- SAIED-SANTIAGO, K.; BÜLOW, H. Diverse roles for glycosaminoglycans in neural patterning. *Developmental Dynamics*, v. 247, n. 1, p. 54–74, 2018.
- SAIJO K, GLASS CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat Rev Immunol.** 2011 Oct 25;11(11):775-87. doi: 10.1038/nri3086. PMID: 22025055.
- SALIM S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **J Pharmacol Exp Ther.** 2017;360(1):201-205. doi:10.1124/jpet.116.237503
- SALMINEN A, KAUPPINEN A, SUURONEN T, KAARNIRANTA K, OJALA J. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. **J Neuroinflammation.** 2009 Dec 26;6:41. doi: 10.1186/1742-2094-6-41. PMID: 20035627; PMCID: PMC2806266.
- SALTER MW, BEGGS S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. **Cell.** 2014 Jul 3;158(1):15-24. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.008. PMID: 24995975.

- SANDERS L. H. GREENAMYRE J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radic. Biol. Med.**62, 111–120.
- SARDET, C. et al. Embryological methods in ascidians: the Villefranche-sur-Mer protocols. In: Vertebrate Embryogenesis. Humana Press, Totowa, NJ. p. 365-400, 2011.
- SCHONEVELD OJ, GAEMERS IC, LAMERS WH (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. **Biochim Biophys Acta** 1680:114–128
- SCHWARTZ, N. B., AND DOMOWICZ, M. 2004. Proteoglycans in brain development. **Glycoconj. J.** 21, 329–341
- SCHWEINGRUBER N, REICHARDT SD, LUHDER F, REICHARDT HM (2012) Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **J Neuroendocrinol** 24:174–182
- SEE WZC, NAIDU R, TANG KS. Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. **Mol Neurobiol.** 2022 Jun;59(6):3353-3369. doi: 10.1007/s12035-022-02799-2. Epub 2022 Mar 19. PMID: 35306641; PMCID: PMC9148284.
- SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Paraquat intoxication. *Acta medica portuguesa*, v. 16, n. 1, p. 25–32, 2003.
- SHAH, I.; MACRAE, I.; DI NAPOLI, M. Neuroinflammation and neuroprotective strategies in acute ischaemic stroke-from bench to bedside. *Current molecular medicine*, v. 9, n. 3, p. 336-354, 2009
- SHEARMAN M, HAWTIN S, TAYLOR V (1995) The intracellular component of cellular 3-(4:5-dimethylthiazol-2-yl)-2:5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by  $\beta$ -amyloid peptides. **J Neurochem** 65:218–227.
- SHIVELY, J. E., and CONRAD, H. E. 1976. Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry* 15: 3932-3942.
- SIEGAL T, SIEGAL T, SHOHAMI E, SHAPIRA Y (1988) Comparison of soluble dexamethasone sodium phosphate with free dexamethasone and indomethacin in treatment of experimental neoplastic spinal cord compression. **Spine** (Phila Pa 1976) 13:1171–1176
- SILBERT, J. E., AND SUGUMARAN, G. 2002. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. **IUBMB Life** 54, 177–180
- SILVA, M. F. R.; SALDIVA, P. H. N. Paraquat poisoning: An experimental model of dose-dependent acute lung injury due to surfactant dysfunction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 3, p. 445–450, 1998.
- SIMPSON, D. S. A., & OLIVER, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. **Antioxidants**, 9(8), 743. 2020.
- SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain research reviews*, v. 54, n. 2, p. 233-250, 2007.
- SOLEMAN S, FILIPPOV MA, DITYATEV A, FAWCETT JW. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. **Neuroscience.** 2013 Dec 3;253:194-213. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.050. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012743.

- SOUSA, G. F. et al. Dermatan sulfate obtained from the *Phallusia nigra* marine organism is responsible for antioxidant activity and neuroprotection in the neuroblastoma-2A cell lineage. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.
- STEVENSON JL, CHOI SH, VARKI A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. **Clin Cancer Res.** 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):7003-11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1131. PMID: 16203794.
- SUGAHARA K., MIKAMI T., UYAMA T., MIZUGUCHI S., NOMURA K., KITAGAWA H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 13, 612–620. 2003.
- SWANN DA. 1968. Studies on hyaluronic acid. I. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta.*; 156(1):17-30.
- SWERDLOW, R. Treating neurodegeneration by modifying mitochondria: potential solutions to a “complex” problem. *Antioxidants & redox signaling*, v. 9, n. 10, p. 1591-1604, 2007.
- TAETZSCH, T., & BLOCK, M. L. (2013). Pesticides, Microglial NOX2, and Parkinson's Disease. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**,
- TAKUMA K, FANG F, ZHANG W, et al. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004;106:20021-6.
- TAN, G.; TABATA, Y. Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF-κB nuclear translocation. *Acta biomaterialia*, v. 10, n. 6, p. 2684-2692, 2014.
- TANNER CM, KAMEL F, ROSS GW, HOPPIN JA, GOLDMAN SM, KORELL M, MARRAS C, BHUDHIKANOK GS, KASTEN M, CHADE AR, COMYNS K, RICHARDS MB, MENG C, PRIESTLEY B, FERNANDEZ HH, CAMBI F, UMBACH DM, BLAIR A, SANDLER DP, LANGSTON JW. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect.** 2011 Jun;119(6):866-72. doi: 10.1289/ehp.1002839. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21269927; PMCID: PMC3114824.
- TARASOFF-CONWAY, J.M., CARARE, R.O., OSORIO, R.S., GLODZIK, L., BUTLER, T., FIEREMANS, E., AXEL, L., RUSINEK, H., NICHOLSON, C., ZLOKOVIC, B.V., FRANGIONE, B., BLENNOW, K., MÉNARD, J., ZETTERBERG, H., WISNIEWSKI, T., DE LEON, M.J., 2015. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurol.** 11, 457–470.
- TARPLEY, M.M., D.A. WINK, AND M.B. GRISHAM. Methods for detection of reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.** (2004)
- TERRON A, BAL-PRICE A, PAINI A, MONNET-TSCHUDI F, BENNEKOU SH, SCHILDKNECHT, S. 2017. An adverse outcome pathway for parkinsonian motor deficits associated with mitochondrial complex I inhibition. **Archives of Toxicology**, 92(1), 41–82.
- THAKUR P, NEHRU B. Inhibition of neuroinflammation and mitochondrial dysfunctions by carbenoxolone in the rotenone model of Parkinson's disease. **Mol Neurobiol.** 2015;51(1):209-219. doi:10.1007/s12035-014-8769-7
- THAKUR, P., & NEHRU, B. 2014. Inhibition of Neuroinflammation and Mitochondrial Dysfunctions by Carbenoxolone in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 209–219.

- THUNBERG, L., BÄCKSTRÖM, G., GRUNDBERG, H., RIESENFELD, J., & LINDAHL, U. (1980). The molecular size of the antithrombin-binding sequence in heparin. *FEBS Letters*, 117(1-2), 203-206. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80945-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80945-8)
- VAJDA FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci*. 2002 Jan;9(1):4-8. doi: 10.1054/jocn.2001.1027. PMID: 11749009.
- VEZZANI, B., CARINCI, M., PATERGNANI, S., PASQUIN, M. P., GUARINO, A., AZIZ, N., GIORGI, C. (2020). The Dichotomous Role of Inflammation in the CNS: A Mitochondrial Point of View. *Biomolecules*, 10(10), 1437. doi:10.3390/biom1010143
- VOLPI, Nicola; M., Francesca. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequivalvis*. *Glycobiology*, v. 19, n. 4, p. 356-367, 2009.
- VON OSSOWSKI I., HAUSNER G., LOEWEN P. C. (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J. Mol. Evol.* 37 71–76. 10.1007/BF00170464
- SASO L, FIRUZI O. Pharmacological applications of antioxidants: lights and shadows. *Curr Drug Targets*. 2014;15(13):1177-1199. doi:10.2174/1389450115666141024113925
- WALKER e LUE. Anti-inflammatory and Immune Therapy for Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 2007, Vol. 5, No. 4
- WANG K., ZHANG T., DONG Q., NICE E. C., HUANG C., WEI Y., Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation, *Cell Death Dis.* 4 (3) (2013) e537-e537.
- WANG, SHOUTANG. COLONNA, MARCO. Microglia in Alzheimer's disease: A target for immunotherapy . *Journal of Leukocyte Biology*. 2019. DOI: 10.1002/JLB.MR0818-319R
- WILSON A. J., FADARE O., BEEGHLY-FADIEL A., et al. Aberrant over-expression of COX-1 intersects multiple pro-tumorigenic pathways in high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6(25):21353–21368. doi: 10.18632/oncotarget.3860
- WISNIEWSKI, H.M., BARCIKOWSKA, M., KIDA, E., 1991. Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol.* 81, 588–590
- WU, D. C., RE, D. B., NAGAI, M. *et al.* (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12132-12137.
- XIAO HX, SONG B, LI Q, SHAO YM, ZHANG YB, CHANG XL, ZHOU ZJ. Paraquat mediates BV-2 microglia activation by raising intracellular ROS and inhibiting Akt1 phosphorylation. *Toxicol Lett*. 2022 Feb 1; 355:116-126.
- YAN, D., ZHANG, Y., LIU, L. et al. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6, 32222 (2016).
- YANG, C. S., LEE, H. M., LEE, J. Y. *et al.* (2007). Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J. Neuroinflammation* 4, 27.
- YU Y, LI Z., CAO G., HUANG S., YANG H.. Bamboo leaf flavonoids extracts alleviate oxidative stress in HepG2 cells via naturally modulating reactive oxygen species production and Nrf2-mediated antioxidant defense responses, *J. Food Sci.* 84 (6) (2019) 1609–1620.

- YUE XL, LEHRI S, LI P, BARBIER-CHASSEFIERE V, PETIT E, et al. 2009. Insights on a new path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic. *Cell Death Differ* 16: 770–781.
- ZHANG H, UCHIMURA K, KADOMATSU K. Brain keratan sulfate and glial scar formation. **Ann N Y Acad Sci**. 2006 Nov;1086:81-90. doi: 10.1196/annals.1377.014. PMID: 17185507.
- ZHANG Q, LI J, LIU C, SONG C, LI P, YIN F, XIAO Y, LI J, JIANG W, ZONG A, et al. 2015. Protective effects of low molecular weight chondroitin sulfate on amyloid beta (A $\beta$ )-induced damage in vitro and in vivo . *Neuroscience*. 305: 169-182.
- ZHANG, JIANHUA, YU FU, PENG YANG, XIANHU LIU, YIWEN LI AND ZHIPENG GU. ROS Scavenging Biopolymers for Anti-Inflammatory Diseases: Classification and Formulation. **Advanced Materials Interfaces** 7 (2020): n. pag.
- ZIELASEK J, HARTUNG HP. Molecular mechanisms of microglial activation. **Adv Neuroimmunol**. 1996;6(2):191-22. doi: 10.1016/0960-5428(96)00017-4. PMID: 8876774.