

REGULAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E MEDIADORES
LIPÍDICOS INFLAMATÓRIOS POR COMPOSTOS BIOATIVOS
FLAVONOIDES

LARYSSA DA SILVA LUZ FIRMINO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO DE 2024

REGULAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E MEDIADORES
LIPÍDICOS INFLAMATÓRIOS POR COMPOSTOS BIOATIVOS
FLAVONOIDES

LARYSSA DA SILVA LUZ FIRMINO

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

Orientador: Prof. João Luiz Mendes Wanderley

CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO DE 2024

REGULAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E MEDIADORES
LIPÍDICOS INFLAMATÓRIOS POR COMPOSTOS BIOATIVOS
FLAVONOIDES

LARYSSA DA SILVA LUZ FIRMINO

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

Aprovada em 22 de fevereiro de 2024

Comissão Examinadora:



Profº Drº Clóvis de Paula (Doutor em Medicina Veterinária e Parasitologia
Veterinária) - UENF

Profº Drº Sérgio Henrique Seabra (Doutor em Ciências Biológicas
(Biofísica)) - UENF

Profª Drª Celso Luís Ribeiro Belmiro (Doutor em Química Biológica) - UFRJ

Profº Drº João Luiz Mendes Wanderley (Doutor em Ciências Morfológicas) -
UFRJ

***E são tantas marcas
Que já fazem parte
Do que sou agora
Mas ainda sei me virar...***

AGRADECIMENTOS

Com profunda gratidão, dedico este trabalho a Deus que com todo cuidado, colocou pessoas tão especiais na minha vida. Cada uma delas, enviada por Ele, tem sido um instrumento de Sua graça nesta minha jornada. Mesmo distante da família por tantos anos, senti a mão de Deus me guiando em cada detalhe. A Ele, minha eterna gratidão.

Minha mãe, Cilene, merece um agradecimento especial. Sempre interessada em cada detalhe dos meus experimentos, ouvindo minhas apresentações repetidas vezes, sendo um ombro amigo nos momentos difíceis, me apoiando e encorajando. Sua força e amor têm sido uma inspiração para mim. Ao meu pai, Manoel, que sempre acreditou em mim e me apoiou na busca de todos os meus sonhos.

Aos meus irmãos, Andressa e Vitor, que sempre me lembraram da minha força, meu sincero agradecimento. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus amigos, que se tornaram minha família escolhida, especialmente Gésily, Júlia, Beatriz e Pedro, que cuidaram de mim com amor e amizade. Vocês iluminam minha vida.

E ao meu orientador, João, que esteve ao meu lado desde a iniciação científica, e me encorajou a fazer o mestrado. Sua paciência foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos vocês, dedico este trabalho como um símbolo do meu amor e gratidão. Obrigado por fazerem parte da minha jornada. Deus, em Seu amor e cuidado, tem estado comigo através de cada um de vocês.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Fisiopatologia da Inflamação.....	11
2.2 Mediadores inflamatórios	12
2.3 Corpúsculos Lipídicos	14
2.4 Função dos corpúsculos lipídicos	15
2.5 Vias de sinalização celular	17
2.6 Proteínas quinases C (PKC)	18
2.7 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	18
2.8 Bioflavonoides.....	20
3. OBJETIVO GERAL	22
3.1 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Diferenciação de macrófagos de medula óssea	23
4.2. Ativação de macrófagos e tratamento com flavonoides	23
4.3. Quantificação de corpúsculos lipídicos por Citometria de fluxo	24
4.4 Marcação de corpúsculos lipídicos com Oil Red O (ORO) para localização das organelas por microscopia ótica	24
4.5 Dosagem da produção de eicosanoides	25
4.6 Análise Estatística.....	25
5.RESULTADOS	26
5.1. Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por LPS e Ácido Oleico	26
5.2 Regulação de corpúsculos lipídicos por bioflavonoides	27
5.3. Regulação de mediadores lipídicos inflamatórios por bioflavonoides. ...	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

Lista de Abreviações

PGs: Prostaglandinas
PGE2: Prostaglandina E2
PGD2: Prostaglandina D2
PGI2: Prostaciclina
TXA2: Tromboxano A2
LTB4: Leucotrieno B4
LTA4: Leucotrieno A4
LTD4: Leucotrieno D4
LTE4: Leucotrieno E4
LTs: Leucotrienos
CLs: Corpúsculos lipídicos
LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano
AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais
NF-KB: Fator nuclear kappa B
STATs: Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
COX: Ciclooxigenase
LOX: Lipoxigenase
TLRs: Receptores do tipo Toll-like
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral
IFN- γ : Interferon- γ
ILs: Interleucinas
ROS: Espécies reativas de oxigênio
NOS: Espécies reativas de nitrogênio
iNOS: Óxido nítrico-sintase induzida
AA: Ácido araquidônico
RE: Reticulo endoplasmático
PLINs: Proteínas de revestimento de corpúsculos lipídicos (perilipinas)
PLA2: Fosfolipase A2
AAS: Ácido acetilsalicílico
PGES: Prostaglandina E sintase
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC: Proteína quinase C
MAPKs: Proteínas quinases ativadas por mitógenos
DAG: Diacolglicerol
NRF-2: Fator 2 relacionado ao eritróide 2
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle
M-CSF: Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos
HBSS: Solução Balanceada de Hank's
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
PBS: Tampão fostato-salino
AP- 1: Proteína ativadora-1

Lista de Figuras

- Figura 1.** Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação;
- Figura 2.** Macrófagos em lesões ateroscleróticas;
- Figura 3.** O papel dos CLs nas infecções bacterianas;
- Figura 4.** Efeito da rutina na via de sinalização TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B induzida por LPS em células RAW 264.7;
- Figura 5.** Macrófagos contendo corpúsculos lipídicos corados com Oil Red;
- Figura 6.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que não continham CLs;
- Figura 7.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que não continham CLs;
- Figura 8.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que continham CLs;
- Figura 9.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que continham CLs;
- Figura 10.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com menos de 10 CLs por célula;
- Figura 11.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com menos de 10 CLs por célula;
- Figura 12.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com mais de 10 CLs por célula;
- Figura 13.** Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com mais de 10 CLs por célula;
- Figura 14.** Análise da produção de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo;
- Figura 15.** Regulação da concentração de LTB₄ por rutina e quercetina.
- Figura 16.** Regulação da concentração de PGE₂ por rutina e quercetina.

RESUMO

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas essenciais nas células, desempenhando múltiplas funções. Além de contribuírem para a síntese de eicosanoides, essas estruturas servem como locais de alocação para diversas enzimas, fatores de crescimento, GTPases, enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e proteínas quinases. Sua multifuncionalidade os torna extremamente relevantes na sinalização celular, na regulação do metabolismo lipídico e no controle da produção de mediadores inflamatórios. Assim, a regulação da atividade dos corpúsculos lipídicos pode ser estratégica para o controle de processos inflamatórios e infecciosos. Os bioflavonoides são fitoquímicos que, ao longo dos anos, têm demonstrado propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas e antitumorais. Neste estudo, investigamos se os bioflavonoides rutina e quercetina inibem a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4) por meio da regulação dos corpúsculos lipídicos em macrófagos ativados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Para isso, realizamos a quantificação dos corpúsculos lipídicos por microscopia ótica e citometria de fluxo, e a dosagem dos eicosanoides por ensaio de competição por ELISA. Os resultados indicam que os bioflavonoides investigados reduzem a produção de CLs, tendo a quercetina apresentado uma diminuição significativa. Quanto à produção de eicosanoides, ambos os tratamentos resultaram em menor produção de PGE2 e LTB4. Notavelmente, a rutina demonstrou maiores reduções. Concluimos que a atividade anti-inflamatória desses bioflavonoides parece estar relacionada aos corpúsculos lipídicos, especialmente no tratamento com quercetina.

ABSTRACT

Lipid bodies (LCs) are essential organelles in cells, performing multiple functions. In addition to contributing to the synthesis of eicosanoids, these structures serve as allocation sites for several enzymes, growth factors, GTPases, enzymes involved in lipid metabolism and protein kinases. Their multifunctionality makes them extremely relevant in cell signaling, regulating lipid metabolism and controlling the production of inflammatory mediators. Thus, regulating the activity of lipid bodies can be strategic for controlling inflammatory and infectious processes. Bioflavonoids are phytochemicals that, over the years, have demonstrated antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic and anti-tumor properties. In this study, we investigated whether the bioflavonoids rutin and quercetin inhibit the production of prostaglandin E2 (PGE2) and leukotriene B4 (LTB4) through the regulation of lipid bodies in macrophages activated with bacterial lipopolysaccharide (LPS). To this end, we quantified lipid bodies by optical microscopy and flow cytometry, and measured eicosanoids by competition assay by ELISA. The results indicate that the bioflavonoids investigated reduce the production of LCs, with quercetin showing a significant decrease. Regarding eicosanoid production, both treatments resulted in lower production of PGE2 and LTB4. Notably, the routine demonstrated greater reductions. We conclude that the anti-inflammatory activity of these bioflavonoids appears to be related to lipid bodies, especially in quercetin treatment.

Keywords: lipid bodies, eicosanoids, bioflavonoids.

1.INTRODUÇÃO

Os CLs são organelas citoplasmáticas que desempenham a função de armazenamento de energia em adipócitos e outros tipos celulares. Além disso, essas organelas atuam como locais de síntese de mediadores lipídicos inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, contribuindo para a ativação inflamatória de células do sistema imunológico (Bozza *et al.*, 2010).

Os eicosanoides, moléculas derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, controlam processos de ativação, migração, proliferação e morte celular (Kumar *et al.*, 2018). Portanto, a regulação da atividade dos corpúsculos lipídicos pode ser uma estratégia eficaz para controlar processos inflamatórios e infecciosos.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm a capacidade de inibir os corpúsculos lipídicos. No entanto, quando usados por um período prolongado, podem causar efeitos adversos, como reações de hipersensibilidade, danos ao trato gastrointestinal e efeitos cardiovasculares (Grosser e cols., 2006). Por outro lado, os flavonoides, compostos polifenólicos naturais encontrados em vários vegetais, possuem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antialérgicas e antimicrobianas. Essas moléculas podem interferir na resposta inflamatória por meio da NFκB, proteínas STATS e PI3K, regulando indiretamente a inflamação e controlando, por exemplo, a produção de espécies reativas de oxigênio (González-Mosquera *et al.*, 2018; Hanáková *et al.*, 2017).

Embora seja conhecido que os flavonoides reduzem a produção de eicosanoides ao interferir na atividade da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), pouco se sabe sobre a regulação dessas substâncias na produção de CLs. Com isso, avaliamos o papel desses compostos na regulação da resposta inflamatória mediada por essa via, sugerindo uma possível alternativa ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiopatologia da Inflamação

A inflamação é, fundamentalmente, um mecanismo de defesa cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão (Kumar *et al.*, 2005). Trata-se de um processo essencial para a sobrevivência dos organismos, uma resposta protetora que permite a reparação do tecido lesionado, necrótico ou invadido por microrganismos, restaurando-o ao seu estado original. Essa é uma reação complexa que envolve principalmente a presença de leucócitos e proteínas plasmáticas nos vasos sanguíneos, que são recrutados para locais extravasculares. A resposta inflamatória é iniciada quando fatores solúveis são produzidos em resposta a estímulos inflamatórios, sejam eles causados por microrganismos ou células necróticas. Isso permite reações vasculares e a produção de mediadores inflamatórios que amplificam essa resposta e determinam seu padrão (Kumar *et al.*, 2018).

Durante a inflamação, os vasos sanguíneos se dilatam e se tornam permeáveis a fluidos e proteínas. Células como monócitos e linfócitos são atraídas para o local da lesão ou infecção por um gradiente químico conhecido como quimiotaxia. As reações inflamatórias são desencadeadas por diversos estímulos que são reconhecidos por receptores localizados na membrana plasmática e nos endossomos (Kumar *et al.*, 2018). Os mais importantes são os receptores do tipo Toll-like (TLRs), que reconhecem patógenos como bactérias, fungos e vírus. Os mamíferos produzem pelo menos 10 TLRs diferentes, cada um específico para um ligante. Quando o patógeno é reconhecido, esses receptores ativam fatores de transcrição, como NF- κ B, e estimulam a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Entre essas moléculas estão os sinalizadores lipídicos, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, e as moléculas sinalizadoras proteicas chamadas citocinas. As citocinas pró-inflamatórias mais importantes são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o interferon- γ (IFN- γ), as quimiocinas, que são responsáveis por recrutar leucócitos, e as interleucinas (ILs), incluindo IL-1, IL-6, IL-12 e IL-17 (Alberts *et al.*, 2017).

Após a ativação leucocitária e a migração dessas células para o local da inflamação, leucócitos como neutrófilos e macrófagos se ligam e ingerem microrganismos patogênicos e células mortas por meio da fagocitose (Abbas *et al.*, 2022). Nesse processo, as partículas ingeridas são degradadas no fagolisossomo por

meio de substâncias microbicidas. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as enzimas lisossômicas são as substâncias mais importantes nesse processo.

As ROS são capazes de destruir micróbios e células necróticas aumentando a expressão de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, e amplificando a cascata inflamatória. As espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), atuam de maneira semelhante às ROS. O NO é um radical livre que, ao reagir com O₂, forma um composto altamente reativo (peroxinitrito) que participa da lesão celular. Os macrófagos utilizam o NO como metabólito citotóxico (Kumar *et al.*, 2018).

2.2 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios, como os eicosanoides, são provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado que compõe os fosfolipídios da membrana celular (Figura 1). Eles influenciam intrinsecamente o processo inflamatório, mediando cada etapa da inflamação, como ativação, migração, proliferação e morte celular. Por essa razão, esses sinais são os principais fatores na homeostase tecidual, defesa do hospedeiro e câncer (Bozza *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2012). Eles são sintetizados nos locais da resposta inflamatória e são intensificados por mecanismos induzíveis, como citocinas e estímulos pró-inflamatórios. A liberação do AA ocorre por meio das fosfolipases, enzimas presentes nos fosfolipídios que hidrolisam ligações éster. A partir disso, duas vias enzimáticas estimulam a síntese de prostaglandinas e tromboxanos (via COX) e leucotrienos e lipoxinas (via LOX) (Zanini *et al.*, 2018).

A ciclooxigenase (COX) é a enzima-chave que catalisa a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas e tromboxanos. Existem dois tipos de ciclooxigenase: a COX-1, que está presente em todos os tecidos e produz prostaglandinas envolvidas em processos fisiológicos como a proteção do epitélio gástrico, a manutenção do fluxo renal e a agregação plaquetária através da produção de tromboxanos; e a COX-2, uma isoforma induzível liberada em resposta a estímulos inflamatórios como citocinas (TNF- α), interleucina, fatores de crescimento e outros mediadores (González-Mosquera *et al.*, 2018; Hanáková *et al.*, 2017). Por essa razão, foram desenvolvidos fármacos que inibem a COX-2 com o objetivo de inibir a inflamação sem bloquear os efeitos protetores das prostaglandinas. Contudo, a inibição da COX-2 aumenta os riscos de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Kumar *et al.*, 2018).

A via da ciclooxigenase (COX) gera as prostaglandinas E2 (PGE₂), PGD₂, PGF_{2a}, PGI₂ (prostaciclina) e tromboxano A₂ (TXA₂) (KUMAR *et al.*, 2018). A PGE₂ atua como mediador de sinalização lipídica, é extremamente versátil e pode influenciar vários fenômenos que determinam o caráter inflamatório (Bhattacharjee *et al.*, 2016). Ela pode prejudicar a capacidade microbicida do macrófago e, ao inibir as citocinas Th1, induz uma tendência Th2 em células T. A inibição de Th1 demonstrou prevenir danos teciduais causados pelo processo inflamatório na doença gastroduodenal e na inflamação hepática (Bhattacharjee *et al.*, 2016). Os leucotrienos, por outro lado, são produzidos pela via LOX, gerando LTA₄, que origina o LTB₄ (produzidos por neutrófilos e macrófagos), um agente quimiotático, ou LTC₄ e seus metabólitos, LTD₄ e LTE₄, que causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (Kumar *et al.*, 2018). A via da 5-LOX resulta na síntese dos LTs, que desempenham um papel importante no desenvolvimento e na persistência da resposta inflamatória durante a infecção de macrófagos. O LTB₄ mostrou ser dependente da produção de NO, controlando a morte, a desgranulação e a produção de ROS de *L. amazonensis*. Portanto, os LTs são essenciais para eventos iniciais da cascata, ativando mediadores cruciais no controle inflamatório (Tavares *et al.*, 2014).

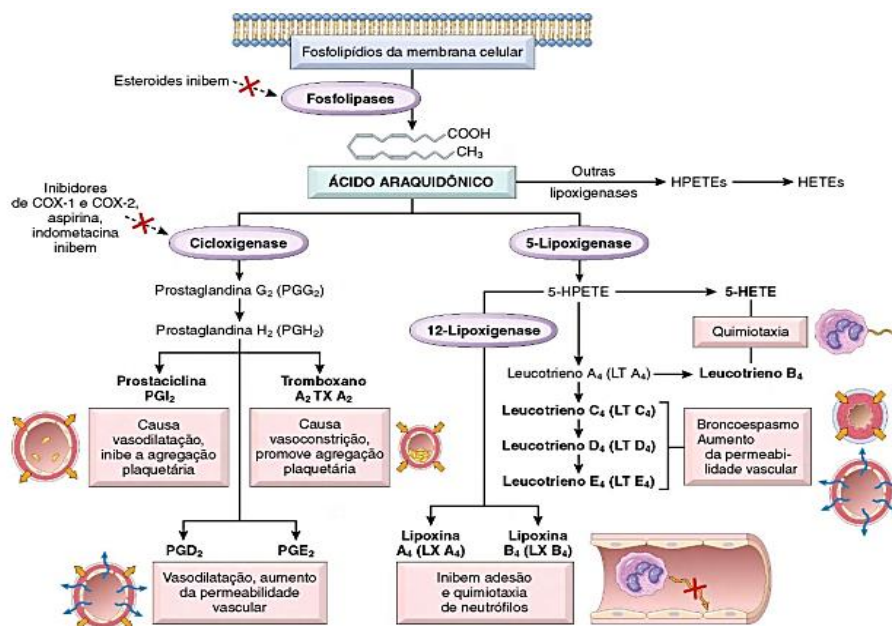


Figura 1. Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação (Robbins, patologia básica, 2013).

2.3 Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas presentes nas células de bactérias, leveduras, plantas e mamíferos (Figura 2). Eles são sintetizados pelo retículo endoplasmático e possuem uma constituição lipídica e proteica. São cercados por uma monocamada de fosfolipídios e possuem proteínas de superfície específicas que estão relacionadas à sua biogênese e mobilização (Bozza *et al.*, 2010). Eles podem exibir tamanhos variáveis dependendo de sua localização e, após serem secretados pelo aparelho de Golgi, são liberados e ficam livres no citosol (Murphy *et al.*, 2001). Inicialmente, acreditava-se que a função dos CLs era apenas o armazenamento e transporte de lipídios neutros. No entanto, atualmente sabe-se que os CLs são organelas com um sistema de regulação complexo, dinâmico e funcionalmente ativo em diferentes condições patológicas (Bozza *et al.*, 2009).

A formação de CLs ocorre inicialmente com lipídios neutros como triglicerídeos e ésteres de colesterol que começam a se acumular no retículo endoplasmático (RE) da célula. Esses lipídios acumulados se unem para criar um núcleo lipídico dentro do RE. Posteriormente, proteínas específicas, denominadas proteínas de revestimento de corpúsculos lipídicos (PLINs), são convocadas para envolver este núcleo lipídico. As PLINs auxiliam na estabilização da estrutura do corpúsculo lipídico. O núcleo lipídico revestido aumenta de tamanho à medida que mais lipídios são adicionados. Este crescimento contínuo resulta na criação de um corpúsculo lipídico maduro (Pereira-Dutra *et al.*, 2019).

Além disso, os CLs podem interagir com outras organelas celulares, como o RE, as mitocôndrias e o complexo de Golgi. Essas interações permitem que os corpúsculos lipídicos desempenhem funções específicas em diferentes contextos celulares. Por último, a biogênese de CLs é regulada de maneira precisa por uma variedade de fatores. Estes incluem hormônios, nutrientes e sinais intracelulares. Esta regulação garante a homeostase lipídica e a função celular adequada. Portanto, a formação e a função dos CLs são processos dinâmicos e altamente regulados para a saúde e a função celular (Pereira-Dutra *et al.*, 2019).

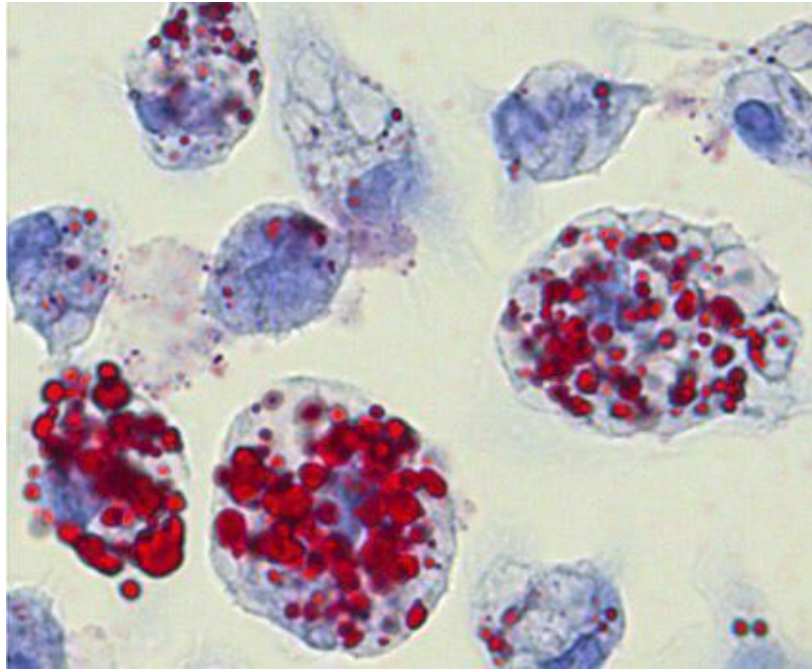


Figura 2. Macrófagos em lesões ateroscleróticas (Hoeksema, 2012)

2.4 Função dos corpúsculos lipídicos

Os CLs atuam como domínios citoplasmáticos, participando da formação de eicosanoides. Eles também funcionam como local de alocação de várias enzimas e fatores de crescimento, GTPases, enzimas de metabolização lipídica e proteínas quinases. Por essa razão, os CLs são extremamente importantes na sinalização celular, na regulação do metabolismo lipídico e no controle da síntese de mediadores inflamatórios (Bozza e Cols *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que essas organelas regulam a resposta inflamatória em vários aspectos coordenando o estresse celular. Foi demonstrado que a localização da fosfolipase A2 (PLA2) na superfície dos CLs após estímulo com ácido oleico ocorre por meio da translocação de enzimas pré-existentes do citoplasma para os CLs, onde participam da síntese de PGE2 (Bozza *et al.*, 2011). Os CLs compartimentalizam enzimas como COX e LOX, ambas usando AA para iniciar a síntese de eicosanoides (Bozza *et al.*, 2011). Além disso, estoques de AA também foram localizados em CLs de leucócitos. Portanto, o aumento no número de CLs em processos inflamatórios está associado à formação de mediadores inflamatórios (Bozza *et al.*, 1996).

Na infecção por *Mycobacterium bovis*, foi demonstrado que a PGE2 derivada dos CLs desempenha um papel na inibição da resposta inflamatória, através da IL-10. Na infecção por *Trypanosoma cruzi*, foi observado um aumento no tamanho e número de CLs após a infecção, e esse aumento foi acompanhado por um aumento na

produção de PGE2 e LTs, que desempenham um papel importante na patogênese da doença de Chagas (D' avila *et al.*, 2008). Quando os eosinófilos são estimulados com PGE2, essas células respondem aumentando o número de CLs (Bozza *et al.*, 2011).

Na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, o estímulo de macrófagos com PGE2 induz um aumento na proliferação parasitária, pois a PGE2 regula negativamente a produção de TNF- α e óxido nítrico (Figura 3). A produção de PGE2 é induzida pelo próprio patógeno, via TLR2 (Bhattacharjee *et al.*, 2016). No entanto, a produção de LTB4 está associada à ativação de NF-kB, à produção de ROS e ao controle da proliferação parasitária (Tavares *et al.*, 2014).

Os CLs podem servir como plataformas para a replicação de patógenos e defesa. Quando ocorre privação de nutrientes, os CLs passam por quebra (lipólise), que começa com os membros associados ao CL da família perilipinas PLIN2 e PLIN3 degradação mediada por chaperona autofagia, um tipo específico de autofagia que degrada seletivamente um subconjunto de proteínas citosólicas em lisossomos (Walther *et al.*, 2017).

Várias classes de medicamentos, como o ácido acetilsalicílico (AAS) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), produzem seus efeitos terapêuticos através do bloqueio da síntese de eicosanoides (Vane e Bottin., 1998). Portanto, a regulação farmacológica da atividade dos CLs pode ser uma estratégia eficaz para regular os processos envolvidos em doenças infecciosas ou inflamatórias.

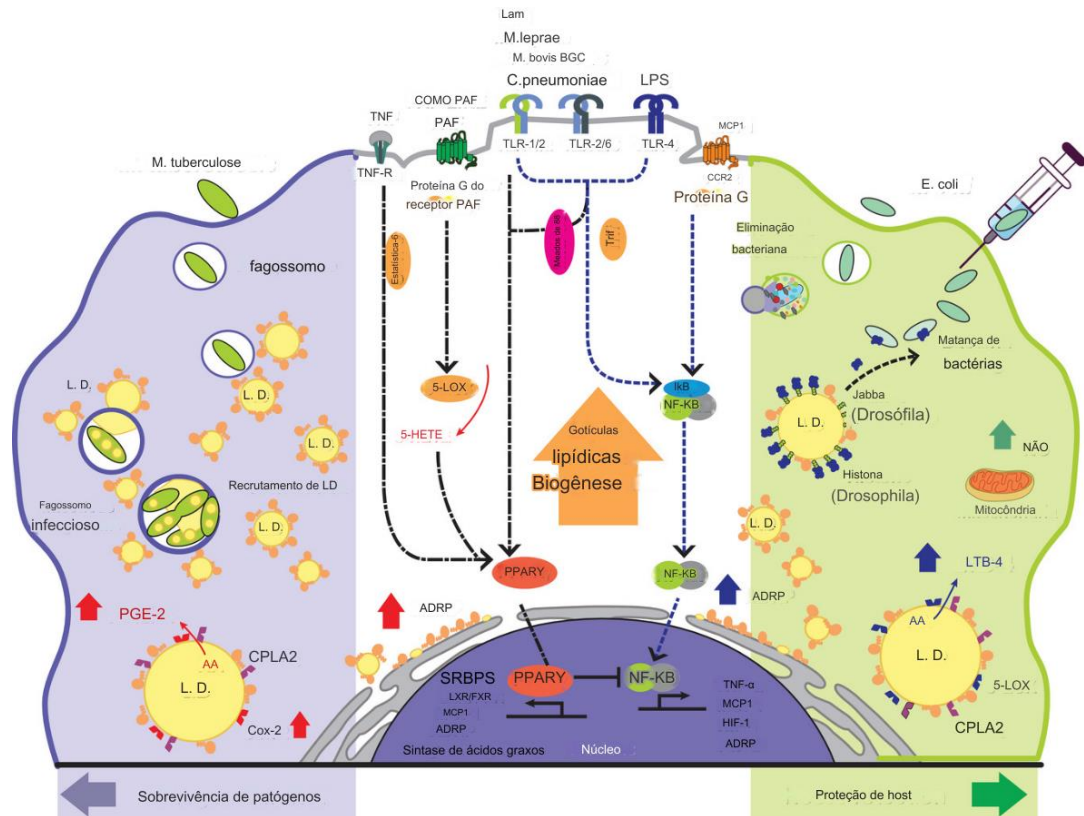


Figura 3. "O papel dos CLs nas infecções bacterianas". Após a indução, as bactérias recrutam os CLs para as proximidades dos endossomos contendo bactérias. A interação de CLs com fagossomas contendo bactérias leva à liberação de conteúdos de CLs, que servem como fonte nutricional para a sobrevivência e proliferação de bactérias patogênicas. Além disso, os CLs também são atores importantes na imunidade inata. A interação patógeno-hospedeiro leva à biossíntese e secreção de mediadores inflamatórios, como PGE2, através das vias da COX-2 derivada do AA. A PGE2 pode potencialmente inibir a resposta Th1, favorecendo assim a proliferação de patógenos. Em contraste com os mecanismos de recrutamento de CLs para o benefício do patógeno, os atores da imunidade inata, como as histonas em *Drosophila*, estão localizados na superfície do CL e podem atuar como proteínas antibacterianas. Além disso, os CLs também são locais de produção de LTB4, um eicosanoide pró-inflamatório da via da lipoxigenase derivada de AA (5-LOX), associado à eliminação do patógeno (adaptado, Pereira-Dutra, 2019).

2.5 Vias de sinalização celular

A síntese de prostanoídes, é um processo complexo que envolve várias etapas. Inicialmente, o ácido araquidônico (AA) é liberado da membrana celular pela ação das fosfolipases A2 (PLA2). O AA é então metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e prostaglandina E sintase (PGES) para formar PGE2 (Bozza *et al.*, 2011). Eles são formados em resposta a vários estímulos, incluindo a ativação de vias de sinalização intracelular, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a proteína quinase C (PKC) e as quinases reguladas por sinal extracelular (MAPKs). A ativação das vias de sinalização intracelular PI3K, PKC e MAPKs pode levar à formação de corpúsculos lipídicos e à liberação de AA, que é então metabolizado para formar eicosanoídes.

Portanto, a regulação dessas vias de sinalização é crucial para a produção de eicosanoides e a regulação de processos biológicos associados (Bozza *et al.*, 2009).

2.6 Proteínas quinases C (PKC)

As enzimas da família PKC são quinases que mediam a transdução de sinal originada na superfície celular. A sinalização envolvendo esta família é iniciada pela hidrólise de fosfolípidios de membrana, mediada por receptor (Newton, 2010). A PKC modula diversos aspectos da fisiologia celular, incluindo angiogênese, motilidade celular, proliferação, diferenciação e apoptose. A função celular depende da capacidade das células de montar respostas dinâmicas a estímulos ambientais. Uma parte crítica desta resposta celular é a modulação rigorosa dos eventos de sinalização (Newton, 2009). A fosforilação é um mecanismo crucial para traduzir sinais ambientais da membrana celular para o citoplasma. A fosforilação celular é controlada por centenas de quinases e fosfatases. Funções celulares globais (como proliferação e apoptose) e funções especializadas (como secreção hormonal) mantêm a homeostase através da fosforilação e desfosforilação de substratos de sinalização (Mosior e Newton 1998)

Após a estimulação extracelular, o diacilglicerol (DAG) e o íon cálcio (Ca^{2+}) gerados na membrana se ligam à PKC. A PKC então sofre translocação do citosol para a membrana e subsequente ativação. Enzimas da família PKC também participam da biogênese de corpúsculos. O PMA é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em neutrófilos (Weller *et al.*, 1991). O envolvimento da PKC na formação de corpúsculos lipídicos também foi demonstrado com o uso de inibidores dessa enzima, que reduzem significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por PAF em eosinófilos e neutrófilos (Bozza *et al.*, 1997)

2.7 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) compõem um grupo diversificado de medicamentos com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. Devido a essas características, são amplamente utilizados no tratamento de dores crônicas e agudas decorrentes de processos inflamatórios, atuando no alívio da febre, dor e inflamação. A ação dos AINEs foi descrita pela primeira vez por Vane e Piper em 1971, quando demonstraram que o ácido acetilsalicílico e os AINEs inibem a síntese das prostaglandinas (PGs), impedindo que o ácido araquidônico (AA) se ligue

ao sítio ativo da enzima ciclooxigenase (COX) (Vane Jr, Botting RM, 1998). Eles são tipicamente divididos em grupos baseados em sua estrutura química e seletividade. Alguns exemplos são: ácidos acetilados salicilatos (aspirina), ácidos não acetilados salicilatos (diflunisal e salsalato), ácidos propiônicos (naproxeno e ibuprofeno), ácidos acéticos (diclofenaco e indometacina), ácidos enólicos (meloxicam e piroxicam), ácidos antranílicos (meclofenamato e ácido mefenâmico).

Tradicionalmente, os AINEs são classificados em inibidores de COX-2 e aqueles que inibem tanto COX-1 quanto COX-2. A busca por AINEs seletivos de COX-2 intensificou-se devido à rápida indução de COX-2 em tecidos inflamados e células infiltrantes. Enquanto COX-1 é uma isoforma expressa predominantemente nas células epiteliais gástricas, sendo a principal fonte de PGs citoprotetoras, a inibição da COX-1 é frequentemente responsável pelos eventos adversos gástricos que complicam o tratamento com AINEs. Isso fornece a justificativa para o desenvolvimento de AINEs específicos para a inibição da COX-2 (Fitzgerald e Patrono, 2001).

Os anti-inflamatórios não esteroidais tradicionais inibem a COX de maneira não seletiva, diminuindo a produção de PGs. Assim, bloqueiam vários eventos de sinalização lipídica. Já os inibidores seletivos de COX-2 (coxibes) inibem a isoforma que é induzida pela inflamação (El-Malahaa *et al.*, 2022). Dentro dessas classes, os medicamentos apresentam substâncias químicas distintas, o que influencia nos efeitos adversos que podem ser provocados. Existe ainda uma subclasse de salicilatos com AAS, muito utilizada como quimioprofilaxia em problemas cerebrais por se ligarem às plaquetas de forma irreversível. No entanto, podem provocar broncoconstrição em pacientes com asma (Lima JC *et al.*, 2021).

Além disso, os AINEs não inibem as LOXs, o que causa um aumento na síntese de LTs, através do desvio de substratos para as vias metabólicas dessas enzimas (Blanca-López *et al.*, 2009; Harirforoosh *et al.*, 2013). Dessa forma, os LTs podem contribuir para efeitos adversos associados aos AINEs, como efeitos gastrointestinais. Estudos demonstraram que os inibidores da COX-2 podem causar vários riscos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, hipertensão sistêmica e pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita cardíaca, através da supressão das PGs derivadas da COX-2 que possuem efeito cardioprotetor, principalmente a prostaciclina (PGI₂) que atua atenuando os estímulos

endógenos para a ativação das plaquetas, a proliferação e a remodelagem dos vasos sanguíneos, a hipertensão, a aterogênese e a função cardíaca (Grosser e Cols, 2006).

2.8 Bioflavonoides

Os bioflavonoides são compostos polifenólicos presentes em diversas espécies vegetais, constituindo uma grande classe de metabólitos vegetais distribuídos em plantas alimentícias. Com mais de 6.000 espécies identificadas, os bioflavonoides são os fitoquímicos mais diversos, demonstrando efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos e antitumorais (González-Mosquera *et al.*, 2018; Hanáková *et al.*, 2017). Os metabólitos formados no fígado alcançam a circulação sanguínea e atingem células-alvo, onde exercem diversas funções benéficas. A atividade anti-inflamatória dos flavonoides pode ocorrer por diferentes mecanismos. Por exemplo, as citocinas, que são produzidas e moduladas por diversos fatores, incluindo o estresse oxidativo, estão envolvidas na patogenicidade de diversas doenças inflamatórias agudas e crônicas. Flavonoides de *Boldoa purpurascens* demonstraram inibir citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-6 produzidas por macrófagos. Além disso, flavonoides com grupos hidroxila C-3 e C-4, como a quercetina, possuem um maior efeito inibitório na liberação de TNF α do que flavonoides com um único grupo OH no anel B. Essas moléculas podem interferir com a atividade de quinases e fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, como o NF-kB (fator nuclear kappa B). Durante a inflamação, as células do sistema imune são ativadas após o reconhecimento de patógenos por diferentes receptores. Esse evento desencadeia uma via de sinalização que culmina na ativação do NF-KB, uma das vias mais importantes envolvidas na inflamação, e conseqüentemente na transcrição de genes como iNOS e COX-2 (González-Mosquera *et al.*, 2018; Hanáková *et al.*, 2017).

Os flavonoides são conhecidos por interagirem com vias de transdução de sinal intracelular, regulando genes relacionados à inflamação. Muitos estudos demonstram a capacidade dessas moléculas de inibir eventos importantes na inflamação, como a proteína ativadora-1 (AP-1), que é outro fator de transcrição importante, pois é regulada por MAPKs. As quinases também regulam a via NF-KB, e é sabido que os flavonoides inibem a fosforilação de todas as MAPKs (Hanáková *et al.*, 2017). Através do seu potencial redox, eles desencadeiam a ativação de outras vias de sinalização, como a NRF2 (fator 2 relacionado ao eritróide 2), que leva à transcrição de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase. Eles também interferem na atividade de

STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição), PKC (proteína quinase C) e PI3K (fosfoinositol 3 quinase) (Lolli *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2015). Essas substâncias têm alto poder antioxidante, controlando a produção de espécies reativas, o que, indiretamente, regula a inflamação tecidual causada por dano celular (Chen *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016). Além disso, os flavonoides podem controlar a atividade efetora de células do sistema imune, como células dendríticas, macrófagos e granulócitos (Li *et al.*, 2017; Weng *et al.*, 2012; Weng *et al.*, 2015), pois já se sabe que os flavonoides têm efeitos diretos e indiretos na atividade de COX-2 e LOX, diminuindo a produção de eicosanoides (González-Mosquera *et al.*, 2018; Hanáková *et al.*, 2017).

A rutina é um bioflavonoide glicosídeo derivado da quercetina, conhecido por seu potencial anticancerígeno, anti-inflamatório (Figura 4), antiviral e antioxidante (Khan *et al.*, 2009, 2012). Estudos demonstraram que a rutina é capaz de diminuir de forma significativa as ROS (Dhanya *et al.*, 2014). Em estudos *in vitro*, ela apresentou efeitos anti-inflamatórios por inibir o NO em neutrófilos (Nick *et al.*, 2017).

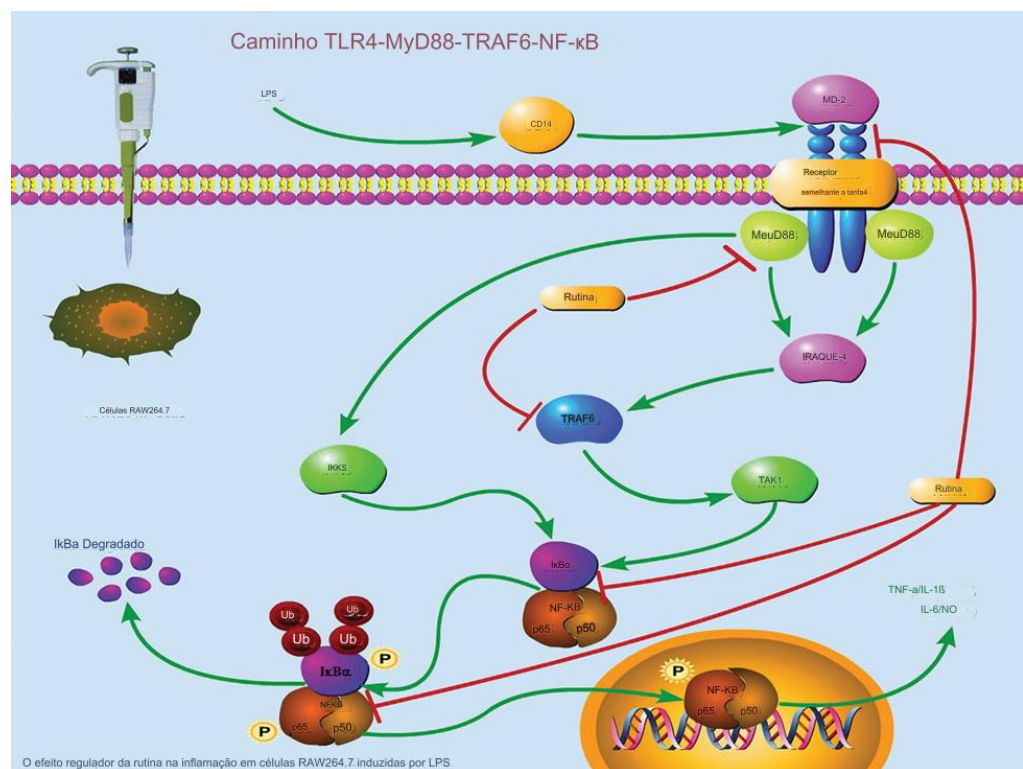


Figura 4. Efeito da rutina na via de sinalização TLR4-MyD88-TRAF6-NF-κB induzida por LPS em células RAW 264.7.

3. OBJETIVO GERAL

Determinar se os flavonoides rutina e quercetina inibem a produção de prostaglandinas através da regulação da síntese ou atividade de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos ativados.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de produção de CLs em macrófagos estimulados por LPS e ácido oleico na presença de quercetina, rutina e indometacina;
- Determinar o tamanho e localização celular dos CLs em macrófagos estimulados por LPS e ácido oleico na presença de quercetina, rutina e indometacina;
- Quantificar a produção de prostaglandina E2 e leucotrieno B4 em macrófagos estimulados por LPS e ácido oleico na presença de quercetina, rutina e indometacina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Diferenciação de macrófagos de medula óssea

Para obtenção de macrófagos diferenciados da medula óssea (BMMo), foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (# CEUA MAC047). Os camundongos com até 8 semanas de idade foram eutanasiados com isoflurano e devidamente higienizados com álcool 70% para retirada do fêmur e da tíbia. Com o auxílio de uma tesoura e pinça, dentro da capela de fluxo laminar, todo o tecido muscular foi retirado dos ossos, e após desarticulação, as epífises também foram removidas. Com auxílio de uma seringa e agulha estéril contendo 10 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM - Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO), 1% de piruvato de sódio (SIGMA), 1% de L-glutamina (SIGMA), 1% de antibiótico (penicilina 100 µl/mL e estreptomicina 100 µl/mL, SIGMA) e 50 µM B-mercaptoetanol, o interior dos ossos foram lavados e o conteúdo homogeneizado. Para diferenciação, as células de medula óssea foram cultivadas em placas de Petri com meio DMEM no volume de 10 mL (2×10^6 /mL de MΦ), contendo 20 ng/mL de M-CSF (Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos - Peprotech) em estufa com atmosfera de 5% CO₂, à 37°C. No quinto dia foi realizada a troca de metade do meio de cultura de cada placa para suplementar a cultura com M-CSF fresco. Após o período de 10 dias o meio foi removido, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e incubadas à 4°C na presença de 5 mL de HBSS+EDTA, para remoção dos macrófagos da placa. As células foram lavadas 2 vezes através de centrifugação à 50g por 10 minutos, 4°C e ressuspensas em DMEM completo.

4.2. Ativação de macrófagos e tratamento com flavonoides

Os macrófagos cultivados em placas de cultura contendo meio DMEM completo, a 37°C, 5% de CO₂, foram ativados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (SIGMA), na presença de 25 µM de rutina (SIGMA), 10 µM de quercetina (SIGMA) e 0,2 µg/mL de indometacina (SIGMA). A indometacina é um AINE que atua inibindo a produção de PGs, substâncias responsáveis por causar inflamação e dor. Por essa razão, foi utilizado como controle positivo da regulação de CLs. Além disso, foi utilizado como controle positivo de ativação o tratamento com 100 µM de ácido oleico. O ácido oleico é um ácido graxo que desempenha um papel importante na formação dos CLs através da incorporação de triglicerídeos e fosfolípidios. Após 24 e 48 horas de incubação as células e o sobrenadante da cultura foram processados

para as análises subsequentes.

4.3. Quantificação de corpúsculos lipídicos por Citometria de fluxo

Para quantificação de CLs ativados e tratados, foram utilizados macrófagos provenientes da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6. O fluorocromo BODIPY 493/503 (BD) que emite fluorescência entre 500 nm a 650 nm e é intensamente fluorescente e eficaz na avaliação de ácidos graxos e fosfolipídios foi utilizado como marcador dos CLs. Compatível com a excitação em laser de íons de argônio a 488 nm, o BODIPY 493/503 é específico para corpúsculos lipídicos, permeando membranas celulares e colorindo seletivamente. O parâmetro de luz utilizado foi o SSC para detecção da composição celular, o parâmetro de fluorescência foi o canal FL1 (530/30). O BODIPY foi diluído em PBS 1x (concentração 1/1.000.000) e incubado por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x gelado (500µl), centrifugadas e ressuspensas em 500 µl.

4.4 Marcação de corpúsculos lipídicos com Oil Red O (ORO) para localização das organelas por microscopia ótica

Em uma placa de 24 poços foram colocadas lamínulas redondas de 13 mm² estéreis, e adicionados 150 µl de macrófagos provenientes da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6, na concentração de 2x10⁶/mL de MΦ. Os macrófagos foram incubados em estufa a 34°C com 5% de CO₂, para a adesão celular nas lamínulas. No dia seguinte, as células foram ativadas e tratadas como descrito anteriormente, e após o período de 6 horas foram coradas com Oil Red O.

Para coloração, os macrófagos foram lavados 2 vezes com PBS 1x e fixados com 300µl de formalina 3,7% por 15 minutos. Depois, enxaguados 2 vezes com água destilada e incubados por 5 minutos com propilenoglicol puro. Cerca de 300 µl - 500 µl de solução de uso de Oil Red O foram utilizados para coloração. Os macrófagos foram incubados por 10 minutos a 60°C. Após esse período, foram adicionados 500 µl de propilenoglicol a 85% durante 5 minutos. E por fim, as células foram lavadas 5 vezes com água destilada. As lamínulas foram montadas com uma gota de meio de montagem Entellan. As lâminas foram armazenadas a 20°C até o dia da análise microscópica (Melo *et al.*, 2011).

4.5 Dosagem da produção de eicosanoides

A análise foi realizada por meio do método ELISA de competição, que se baseia na competição entre o antígeno da amostra dos antígenos adsorvidos na placa pela ligação com anticorpos específicos anti- PGE2 e LTB4. Seis horas após a ativação dos macrófagos e tratamento com flavonoides, 50 µl do sobrenadante foram coletados para a determinação da concentração de prostaglandina E2 e leucotrieno B4. Para isso utilizamos kits de ELISA de competição (Elabscience), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, adicionamos as amostras em uma microplaca previamente adsorvida com LTB4 ou PGE2. Imediatamente após, adicionamos anticorpos biotinilados de detecção anti LTB4 ou PGE2 e incubamos à 37°C por 45 minutos. As placas foram lavadas 3 vezes em tampão PBS contendo 1% de SDS e foi adicionada estreptavidina conjugada a peroxidase para uma incubação de 30 minutos à 37°C. Após a incubação o procedimento de lavagem foi repetido por 5 vezes e foi adicionado o substrato tetrametil-benzidina (TMB). Após incubação de 15 minutos à 37°C, as placas foram levadas a um espectrofotômetro e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 470nm.

4.6 Análise Estatística

Os valores foram expressos como médias \pm SE. A significância das diferenças dos respectivos controles foi realizada por ANOVA seguido do teste Tukey para comparações multiparamétricas. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ serão considerados como indicador de diferenças significativas.

5.RESULTADOS

5.1. Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por LPS e Ácido Oleico

Neste estudo, avaliamos a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos derivados da diferenciação da medula óssea de camundongos da linhagem C57BL/6. A contagem de CLs foi realizada por microscopia óptica após um estímulo inflamatório com ácido oleico e lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, os macrófagos foram tratados com rutina, quercetina e indometacina durante um período de 6 horas (Figura 5).

Os controles para produção de CLs (ácido oleico e LPS) demonstraram as menores porcentagens de macrófagos que não continham CLs (Figura 6 e 7). O controle positivo (ácido oleico) demonstrou 78% e 92% de macrófagos com CLs totais (Figura 8 e 9), e 58% e 52% de macrófagos apresentaram mais de 10 CLs por célula. Já em relação a porcentagem de macrófagos com mais de 10 CLs por célula, o ácido oleico apresentou maior número de CLs, seguido pelo LPS (Figura 10 e 11). Os grupos controle (DMEM), apresentaram 31% e 14%(Figura 12 e 13).

Na concentração de 10 µg/mL, o LPS induziu a formação de CLs em 72% dos macrófagos, enquanto na concentração de 100 µg/mL, a indução foi de 79% (Figura 8 e 9). No que diz respeito à proporção de macrófagos com mais de 10 CLs por célula, a indução foi de 39% e 35%, respectivamente (Figura 12 e 13).

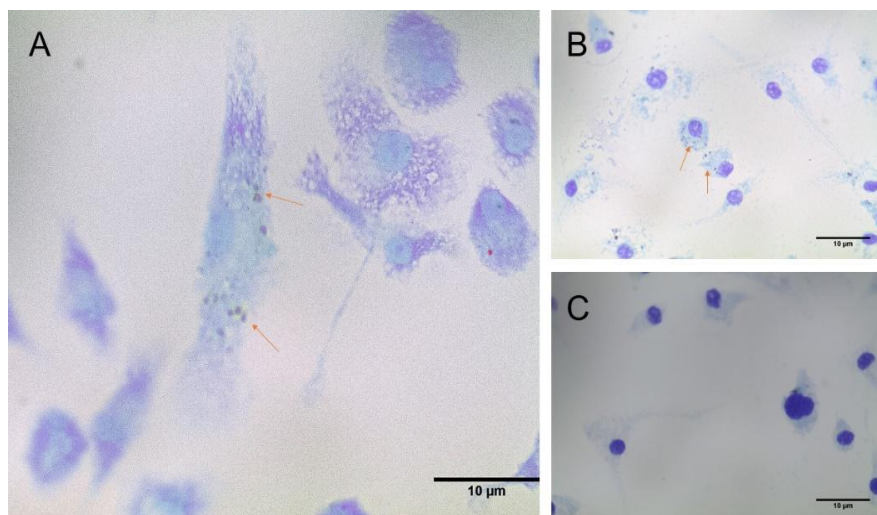


Figura 5. Macrófagos contendo corpúsculos lipídicos corados com Oil Red O (ORO), com contra coloração em Hematoxilina. As imagens A e B indicam macrófagos contendo mais de 10 CLs, e menos de 10 CLs. Enquanto a imagem C indica macrófagos sem CLs.

5.2 Regulação de corpúsculos lipídicos por bioflavonoides

Para avaliação da regulação dos CLs, os macrófagos ativados com LPS foram tratados com rutina, quercetina e indometacina pelo período de 6 horas.

A quercetina apresentou um maior número de macrófagos sem a presença de CLs comparado ao grupo controle, ao ácido oleico e ao LPS (Figura 6 e 7). E diminuiu o número total de CLs em ambas concentrações de LPS (Figura 8 e 9), sendo essa diminuição de 23% em relação a ativação com 10 µg/mL de LPS (Figura 8).

Nos experimentos realizados com 100 µg/mL de LPS não houveram diminuições significativas no tratamento com rutina e quercetina, apenas indometacina diminuiu o número de macrófagos com CLs totais (Figura 9).

Na porcentagem de macrófagos com mais de 10 CLs por célula não observamos diferenças significativas em relação ao controle da produção de CLs pelos bioflavonoides em ambas concentrações de LPS (Figura 10 e 11).

Os resultados demonstraram diminuições significativas no número de CLs em macrófagos ativados com 10 µg/mL de LPS e tratados com quercetina e rutina (Figura 12).

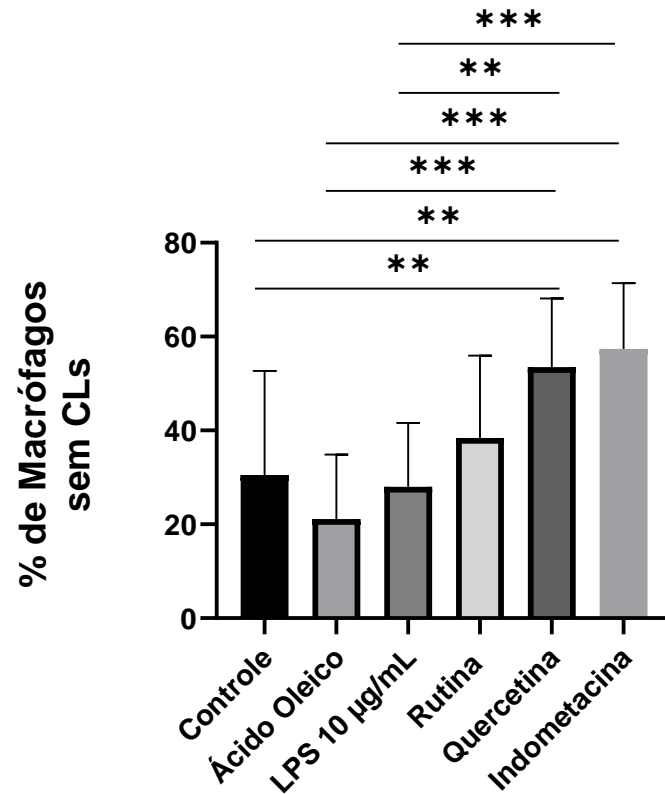


Figura 6- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que não continham CLs. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico $100 \mu\text{M}$ e LPS $10 \mu\text{g/mL}$, tratados com Rutina $25 \mu\text{M}$, Quercetina $10 \mu\text{M}$ e Indometacina $0,2 \mu\text{g/mL}$. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

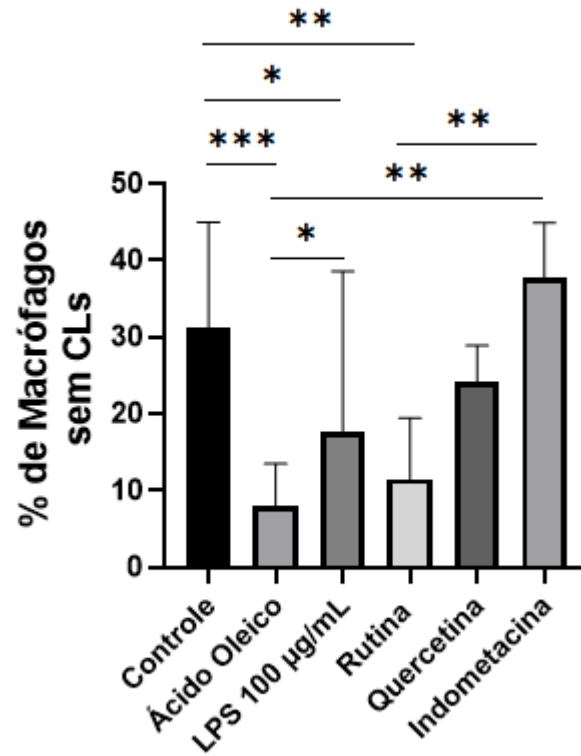


Figura 7- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que não continham CLs. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 100 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

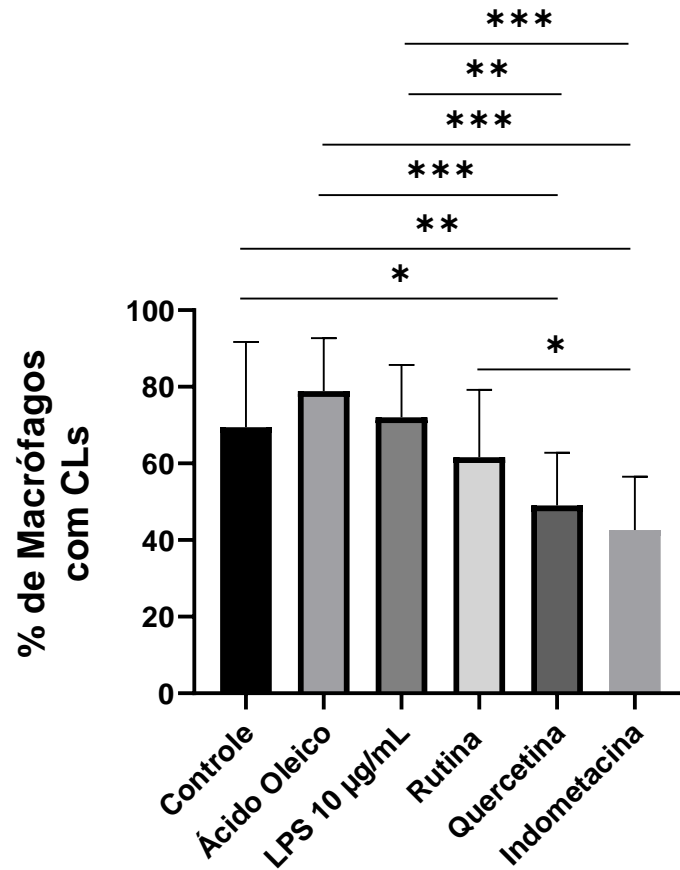


Figura 8- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que continham CLs. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

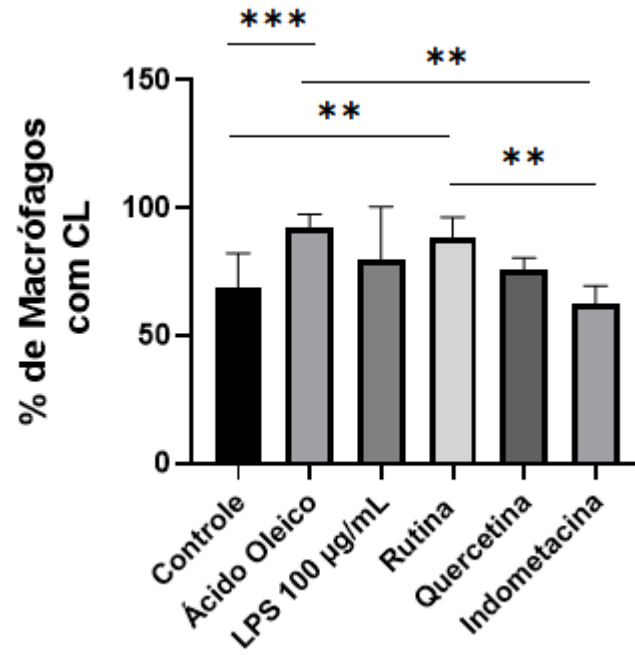


Figura 9- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados que continham CLs. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de M Φ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 100 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

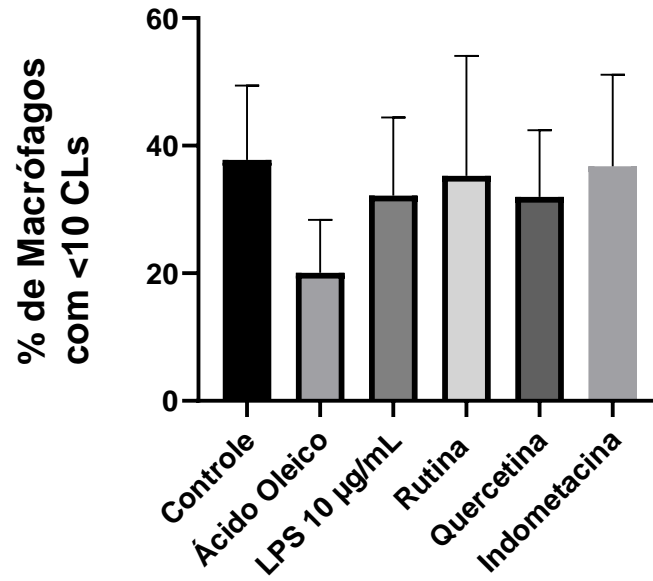


Figura 10- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com menos de 10 CLs por célula. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

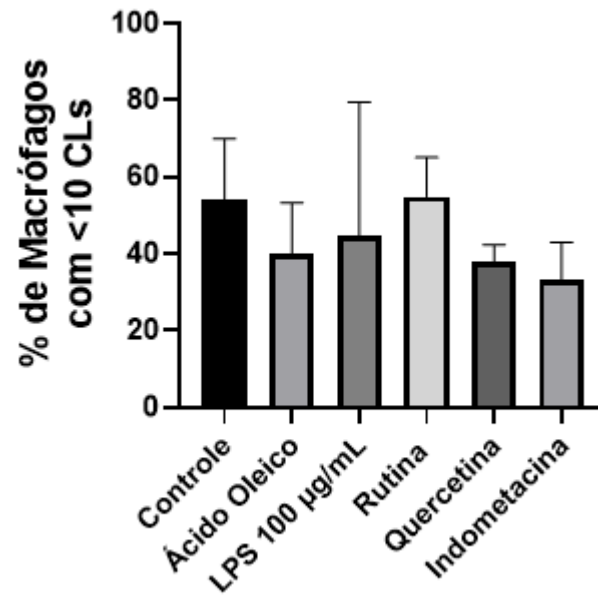


Figura 11- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com menos de 10 CLs por célula. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 100 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

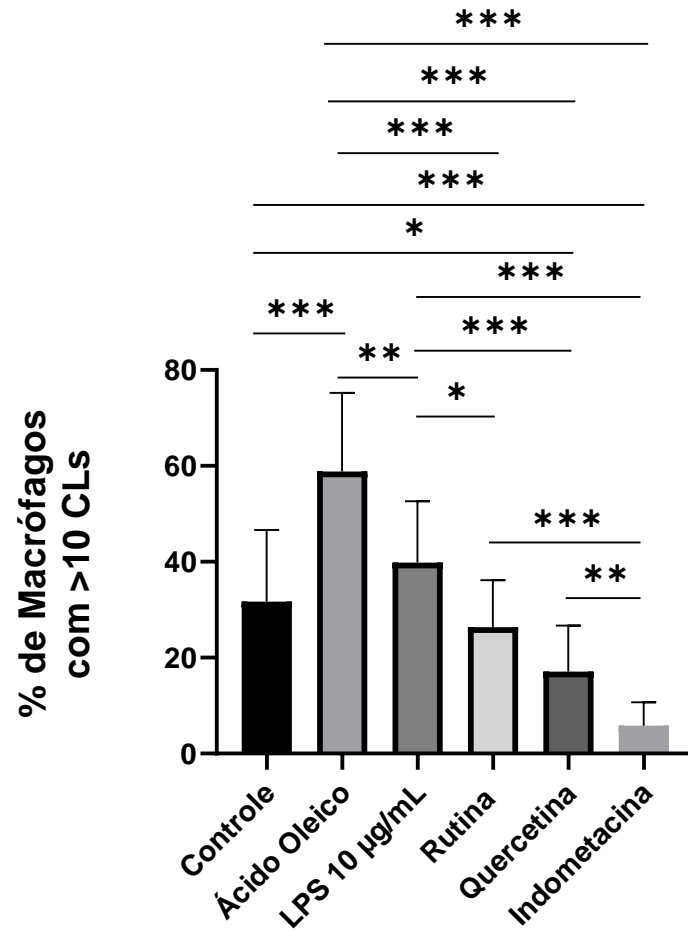


Figura 12- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com mais de 10 CLs por célula. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

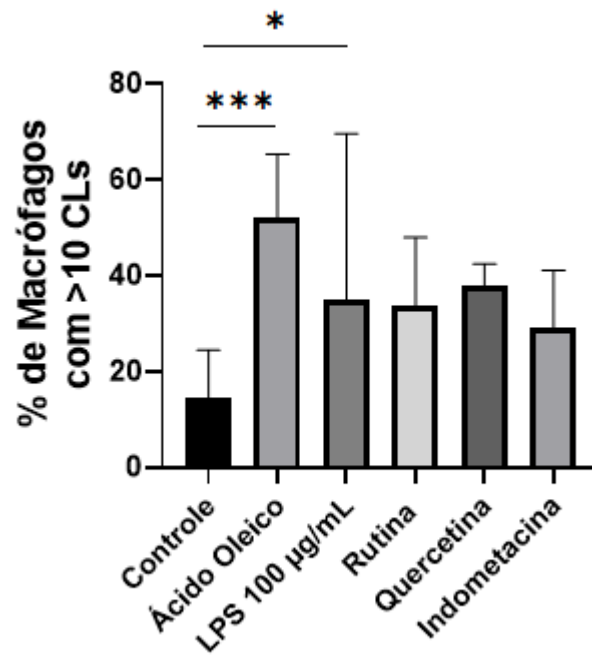


Figura 13- Porcentagem de macrófagos estimulados e tratados com mais de 10 CLs por célula. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 24 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 100 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg/mL. Após o período de 6 horas as células foram fixadas e coradas com Oil Red O para análise por microscopia ótica no aumento de 100x. Os valores expressam a porcentagem de cerca de 300 células contadas por parâmetro. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Avaliamos a produção de corpúsculos lipídicos através de citometria de fluxo. Para isso, macrófagos foram ativados com LPS nas concentrações de 10 e 100 µg/mL e tratados com rutina e quercetina. Após 6 horas, as células foram marcadas com bodipy 495/503, um marcador fluorescente de lipídios, e avaliamos a emissão de fluorescência no canal FL1 (530/30) por citometria de fluxo. Observamos que o tratamento com quercetina diminuiu significativamente o número de corpúsculos lipídicos nos macrófagos ativados com LPS na concentração de 10 µg/mL, quando comparado com macrófagos tratados com rutina (Fig. 14 A e C). Esta modulação não se manteve quando os macrófagos foram estimulados com LPS na concentração de 100 µg/mL.

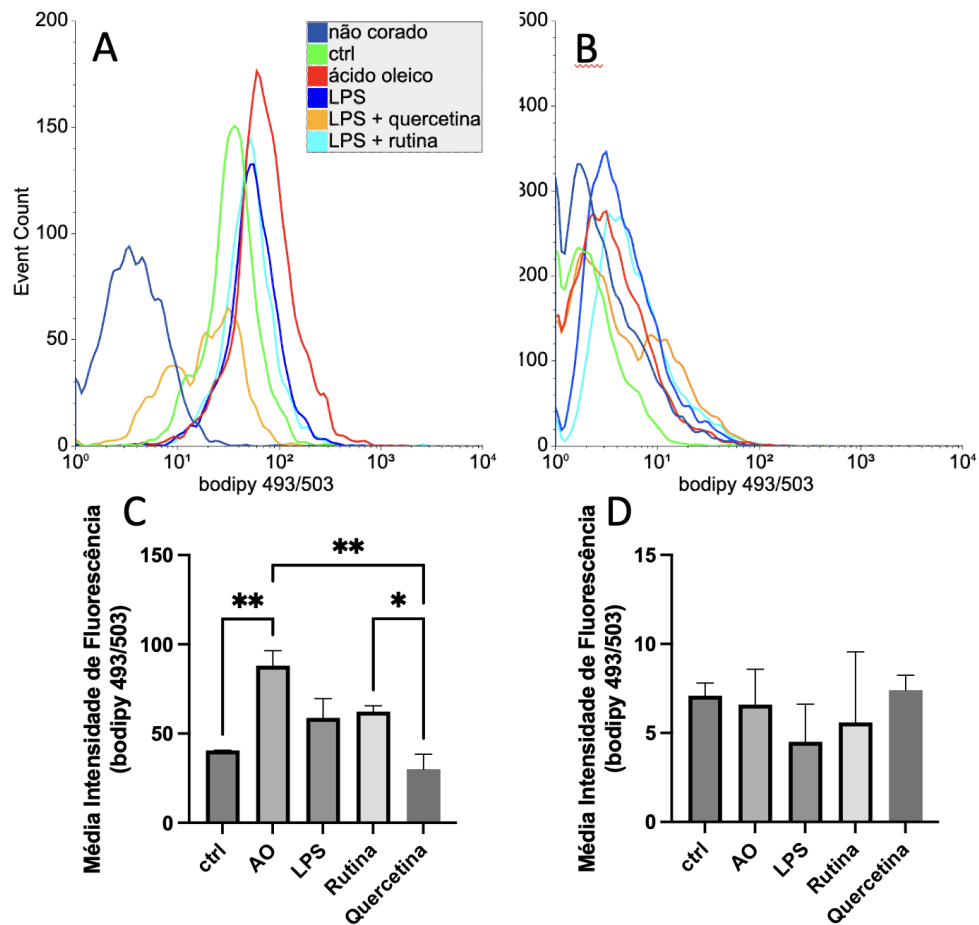


Figura 14 – Análise da produção de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 6 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 (A e C) e 100 μ g/mL (B e D), tratados com rutina a 25 μ M ou quercetina a 10 μ M. Após o período de 6 horas as células foram lavadas com PBS e coradas com bodipy 495/503 diluído em 1/1000000. A fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo no canal FL1 (530/30). Os valores expressam a média de intensidade de fluorescência para a marcação com bodipy. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.3. Regulação de mediadores lipídicos inflamatórios por bioflavonoides.

Para avaliar a regulação de PGE2 e LTB4, os macrófagos foram ativados com LPS nas concentrações de 10 e 100 μ g/mL e posteriormente tratados com rutina, quercetina e indometacina durante um período de 6 horas.

Os resultados demonstraram que as células ativadas com LPS, tanto a 10 μ g/mL quanto a 100 μ g/mL, apresentaram maiores concentrações de PGE2 e LTB4 (Figura 15 e 16).

Em relação à regulação de LTB4, a quercetina demonstrou diminuições significativas nos dois grupos de ativação (LPS 10 e 100 μ g/mL). No entanto, a rutina reduziu drasticamente a concentração de LTB4 no grupo ativado com 100 μ g/mL de LPS. Por outro lado, a indometacina não apresentou diminuições significativas (Figura 15).

Nos grupos ativados e tratados com bioflavonoides, observou-se uma diminuição significativa na síntese de PGE2, principalmente no grupo ativado com 10 µg/mL de LPS. Embora a indometacina tenha reduzido a síntese de PGE2 em comparação com os grupos controle com LPS, a redução não foi tão acentuada quanto a observada com a rutina e a quercetina na ativação com 10 µg/mL de LPS (Figura 16).

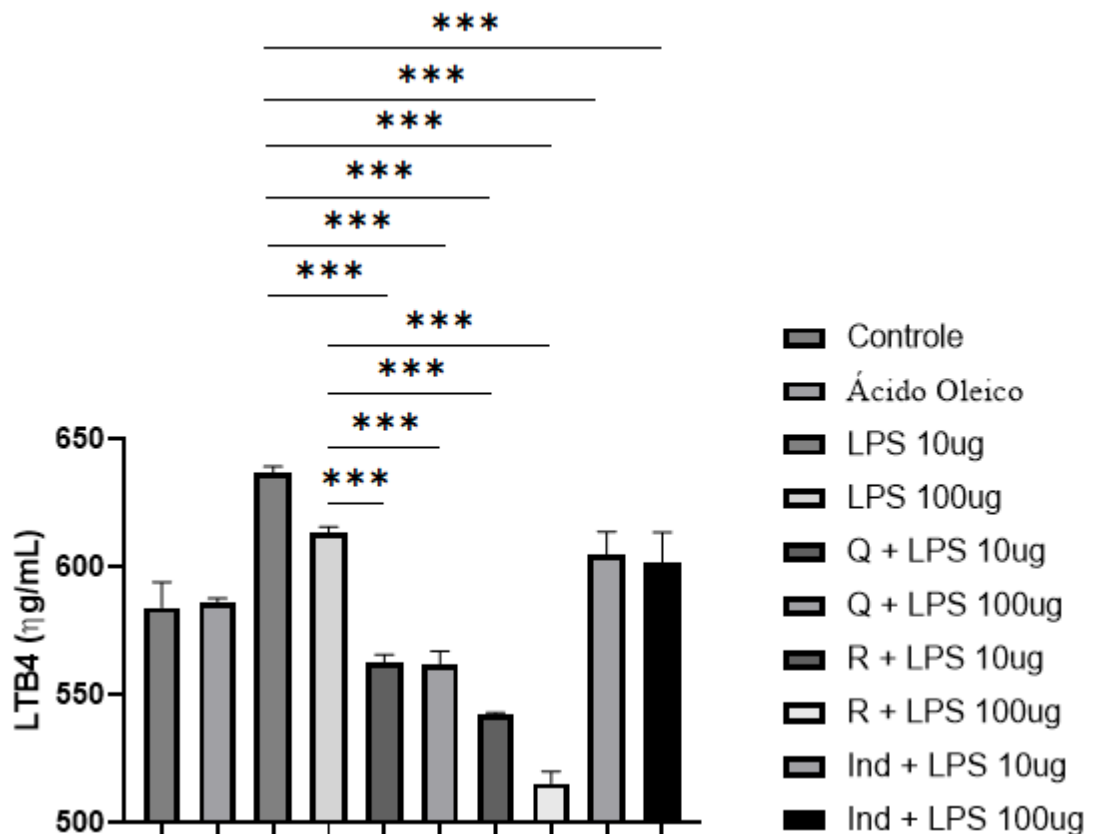


Figura 15- Regulação da concentração de LTB4 por rutina e quercetina. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 48 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 e 100 µg/mL, tratados com Rutina 25 µM, Quercetina 10 µM e Indometacina 0,2 µg. Após o período de 6 horas 50 µl do sobrenadante foi coletado para análise por ELISA de competição. Os valores expressam a concentração de LTB4. Houveram diferenças significativas entre todos os grupos, no gráfico está representado apenas os grupos de ativação com os de tratamento. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

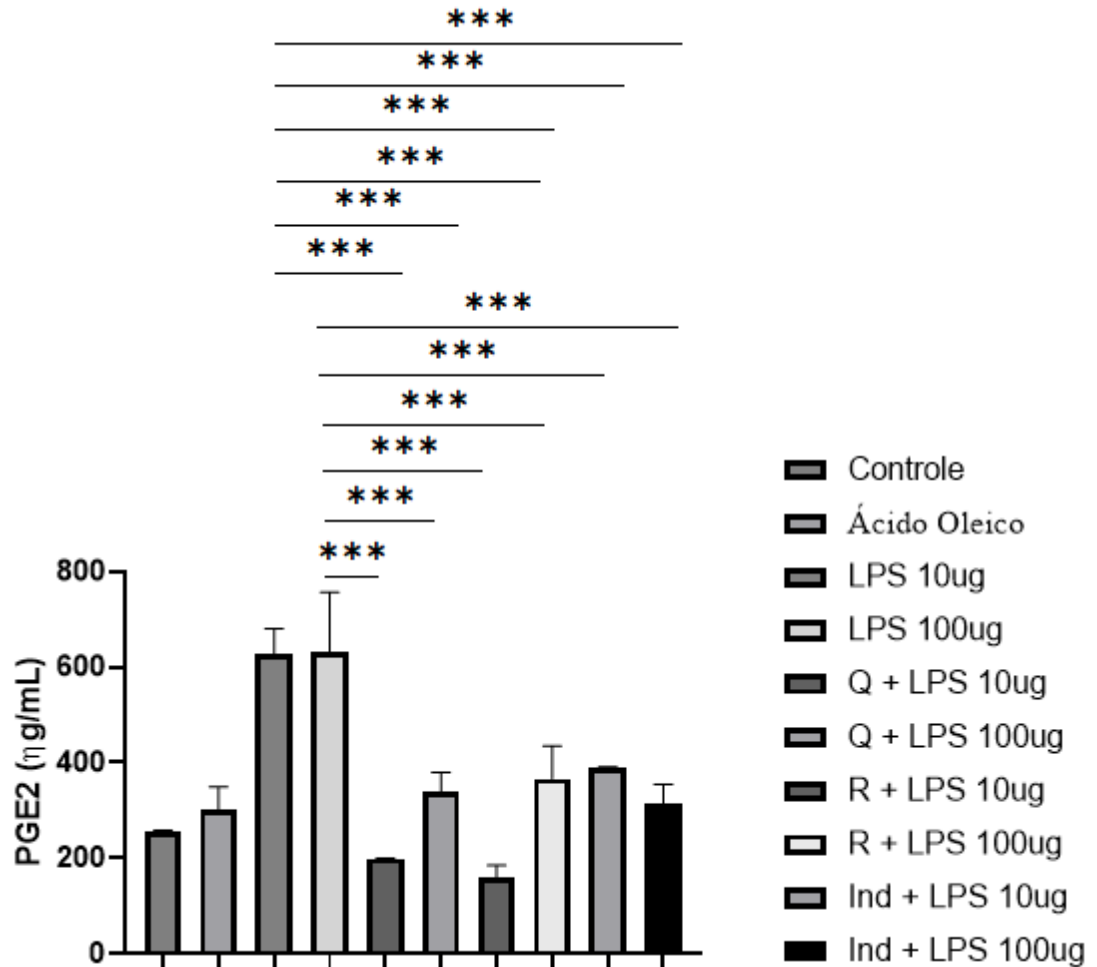


Figura 16- Regulação da concentração de PGE2 por rutina e quercetina. Os macrófagos foram plaqueados na concentração 2×10^6 /mL de MΦ em placas de 48 poços, estimulados com ácido oleico e LPS 10 e 100 μ g/mL, tratados com Rutina 25 μ M, Quercetina 10 μ M e Indometacina 0,2 μ g. Após o período de 6 horas 50 μ l do sobrenadante foi coletado para análise por ELISA de competição. Os valores expressam a concentração de PGE2. As comparações multiparamétricas foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, considerando significativo os valores de * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos a ação dos flavonoides rutina e quercetina na regulação de PGE2 e LTB4, em macrófagos ativados com LPS durante um período de 6 horas, com o objetivo de descobrir se essa regulação é mediada pela via dos CLs.

Nossos resultados demonstraram que a rutina é capaz de diminuir significativamente a síntese de LTB4 e PGE2 em macrófagos ativados com LPS a 10 e 100 µg/mL. Essa diminuição foi mais expressiva do que no grupo tratado com indometacina.

A indometacina é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), derivado do ácido indol-acético. O seu mecanismo de ação abrange a inibição da síntese de todas as PGs, por bloqueio da via mediada pelas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) de forma seletiva ou não seletiva (Barst, Gersony, 1989), bloqueando vários eventos de sinalização lipídica. A COX-1 é expressa em quase todos os tecidos produzindo PGs que possuem papel protetor. As propriedades ácidas de grande parte dos AINEs causam danos à mucosa por permanecerem na região gástrica em sua forma lipofílica não ionizada (Schoen *et al.*, 1989). A patogenia da ulceração aguda pode ser induzida por AINEs causando irritação química direta ou inibindo COX e conseqüentemente a síntese de PGs. Os AINEs podem interferir na citoproteção das prostaglandinas, ou então, reduzem a secreção de bicarbonato, o que também aumenta a possibilidade de lesões na mucosa gástrica (Schoen *et al.*, 1989).

Além disso, os AINEs não inibem a via LOX, levando ao aumento na produção de LTs, que contribuem no surgimento de efeitos gastrointestinais por meio do desvio de substrato para as vias metabólicas dessas enzimas (Blanca-López *et al.*, 2009; Harirforoosh *et al.*, 2013). Isso foi observado em nossos resultados, o tratamento com indometacina não foi capaz de inibir a síntese de LTB4 de forma significativa quando ativado com LPS 100 µg/mL, e embora tenha diminuído a produção de PGE2, essas diminuições não foram tão expressivas quanto no tratamento com rutina e quercetina, tornando esses bioflavonoides uma alternativa ao uso do tratamento de AINEs.

No entanto, embora o tratamento com rutina também tenha diminuído a síntese de CLs, esses dados não foram suficientemente significativos para afirmar que essa regulação ocorre por meio desta via. A produção de LTB4 está geralmente associada à ativação de NF-κB, à produção de RO e NO (Tavares *et al.*, 2014). Estudos recentes

demonstraram que a rutina é capaz de inibir a resposta inflamatória através da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , do conteúdo de NO e da atividade fagocítica. Uma vez que LPS induz a expressão do gene iNOS, esses estudos revelaram que o tratamento com rutina reduziu a transcrição deste gene (Tian *et al.*, 2021). A rutina também pode inibir significativamente a neuroinflamação e fornecer neuroproteção, regulando negativamente os níveis aumentados de expressão da proteína NF- κ B e os níveis de secreção de citocinas inflamatórias (Hao GZ *et al.*, 2016).

Por outro lado, o tratamento com quercetina diminuiu os níveis de PGE2 e LTB4 em ambas as concentrações de LPS (10 e 100 μ g/mL), e foi capaz de diminuir a síntese de CLs em um período de 6 horas em macrófagos ativados com 10 μ g/mL de LPS, isso foi demonstrado nos experimentos com microscopia ótica e citometria de fluxo. No entanto, a diminuição de CLs em macrófagos ativados com 100 μ g/mL de LPS não foi observada, sugerindo que a quercetina não é capaz de regular a síntese de CLs em inflamações de alta intensidade.

Estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicam que a quercetina exibe propriedades anti-inflamatórias notáveis (Assi e El Sayed, 1998). Em experimentos com células PC12 e modelos de zebrafish, a quercetina demonstrou a capacidade de suprimir a inflamação causada pela toxicidade da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), reprimindo a produção excessiva de NO, a enzima iNOS e outros genes associados à inflamação (Zhang *et al.*, 2011).

A quercetina também mostrou eficácia na inibição da inflamação induzida por LPS e Interferon γ , ao anular a expressão de iNOS e regular negativamente várias quinases, incluindo a quinase regulada por sinal extracelular (Kim *et al.*, 2005). Além disso, a quercetina aumentou a expressão da heme-oxigenase (HO)-1 (Sun *et al.*, 2015). Em astrócitos, a quercetina reduziu as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 α (Sharma *et al.*, 2007). A quercetina, em combinação com nanopartículas de β -ciclodextrina-dodecilcarbonato, demonstrou uma forte atividade anti-inflamatória ao regular negativamente TLR4 e COX-2. Esses estudos destacam o potencial da quercetina como um agente anti-inflamatório eficaz. Também se sabe que a quercetina pode inibir o mRNA do TLR-4 e os níveis de expressão da proteína, e regular negativamente a via do NF- κ B (Li X *et al.*, 2016).

Nossa pesquisa demonstrou ser pioneira na relação da quercetina com a regulação dos CLs. Nossos resultados em análises de microscopia ótica e citometria

de fluxo, confirmaram nossa hipótese de que a regulação de PGE2 está relacionada à regulação de CLs na ativação com 10 µg/mL de LPS. No entanto, resta ainda observar se o efeito da quercetina na síntese e atividade de CLs está relacionada com a formação dessas organelas, mobilização de enzimas associadas ao metabolismo do ácido araquidônico ou através de efeito indireto mediado por citocinas inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

A rutina e quercetina possuem capacidade de diminuir a produção de corpúsculos lipídicos. A quercetina, em particular, mostrou uma redução significativa. Em relação à produção de eicosanoides, os tratamentos com ambos os compostos resultam em decréscimos menores de PGE2 e LTB4 em comparação com a ativação por LPS em ambas as concentrações, bem como quando comparados com a indometacina. De forma notável, a rutina apresentou as maiores reduções.

A atividade anti-inflamatória desses bioflavonoides parece estar associada aos corpúsculos lipídicos, especialmente no caso do tratamento com quercetina. No entanto, serão necessários estudos futuros para determinar se o efeito regulatório da quercetina na produção de corpúsculos lipídicos está relacionado à sua formação, à mobilização de enzimas associadas ao metabolismo do ácido araquidônico ou a um efeito indireto mediado por citocinas inflamatórias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhattacharjee, A., Majumder, S., Das, S., Ghosh, S., Biswas, S., Majumdar, S. (2016). Leishmania donovani-Induced Prostaglandin E2 Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2-Cytosolic Phospholipase A2 Signaling. *Infect Immun*, 84(10): 2963-2973.
- Blanca-Lopez, N., Soriano, V., Garcia-Martin, E., Canto, G., Blanca, M. (2019). NSAID-induced reactions: classification, prevalence, impact, and management strategies. *J Asthma Allergy*, 12: 217-233.
- Bozza, P.T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R.A., Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 85(5): 205-213.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Morham, S.G., Langenbach, R., Smithies, O., Weller, P.F. (1996). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (20): 11091-11096.
- González Mosquera, D. M., Hernández Ortega, Y., Fernández, P. L., González, Y., Doens, D., Vander Heyden, Y., ... Pieters, L. (2018). Flavonoids from *Boldoa purpurascens* inhibit proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and the expression of COX-2. *Phytotherapy Research*, 32: 1750–1754.
- Lolli, G., Cozza, G., Mazzorana, M., Tibaldi, E., Cesaro, L., Donella-Deana, A., Meggio, F., Venerando, A., Franchin, C., Sarno, S., Battistutta, R., Pinna, L.A. (2012). *Biochemistry*, 51(31): 6097-6107.
- Chen, G.L., Fan, M.X., Wu, J.L., Li, N., Guo, M.Q. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food Chemistry*, 277: 706-712.
- Hanáková, Z., Hošek, J., Kutil, Z., Temml, V., Landa, P., Vaněk, T., Šmejkal, K. (2017). Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *Journal of natural products*, 80: 999–1006.
- Harirforoosh, S., Asghar, W., Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J Pharm Pharm Sci*, 16(5): 821-47.
- Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J., Chen, D. (2016). Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6 "-OH group. *Molecules*, 21.
- Li, Y., Yu, Q., Zhao, W., Zhang, J., Liu, W., Huang, M., Zeng, X. (2017). Oligomeric proanthocyanidins attenuate airway inflammation in asthma by inhibiting dendritic cells maturation. *Molecular Immunology*, 91: 209–217.

- Melo, R.C., Dvorak, A.M. (2012). Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog*, 8(7): e1002729.
- Yokoyama, T., Kosaka, Y., Mizuguchi, M. (2015). *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (18): 7400-7408.
- Tavares, N.M., Araújo-Santos, T., Afonso, L., et al. (2014). Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. *J Infect Dis*, 210(4): 656-666.
- Weng, Z., Patel, A.B., Panagiotidou, S., Theoharides, T.C. (2015). The novel flavone tetramethoxyluteolin is a potent inhibitor of human mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135: 1044–1052.
- Weng, Z., Zhang, B., Asadi, S., Sismanopoulos, N., Butcher, A., Fu, X., Theoharides, T.C. (2012). Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PloS One*, 7.
- Olzmann, J.A., Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 20: 137-155.
- Bozza, P.T., Magalhães, G.K., Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies- Biogenesis and functions in inflammation. *Molecular and cell biology of lipids*, 1791: 551.
- Bozza, P.T., Viola, J.P.B. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Plefa*, 82: 250.
- D'Avila, H., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T. (2008). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int. Immunoph.*, 8: 1308.
- Murphy, J.D. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid Research*, 40: 325-438.
- Laine, L. (2001). Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology*, 120: 594–606.
- Vane, J.R., Botting, R.M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104(Suppl 3A): 2S–8S.
- El-Malahaa, et al. (2022). Selective COX-2 inhibitors: road from success to controversy and the quest for repurposing. *Pharmaceuticals*, 15(7): 827.
- Santos, E.J., et al. (2021). Anti-inflamatórios não esteroides e problemas renais. *Jornal Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 10(15): 15.22923.
- Schoen, R.T., Vender, R.J. (1989). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med*, 86: 449-458.

- El-Yazbi, A.F., Eid, A.H., El-Mas, M.M. (2018). Cardiovascular and renal interactions between cyclosporine and NSAIDs: Underlying mechanisms and clinical relevance. *Pharmacol. Res.*, 129: 251-261.
- Prozzi, G.R., et al. (2018). Riesgo cardiovascular de los antiinflamatorios No esteroideos. *Medicina (Buenos Aires)*, 78 (5): 349-355.
- Da Silveira Cruz-Machado, S. (2010). Lipopolysaccharide (LPS): potent activator and regulator of gene transcription through NF κ B signaling. *Revista da Biologia*, 4(1): 40-43.
- Eynaudi, A., et al. (2021). Differential effects of oleic and palmitic acids on lipid droplet-mitochondria interaction in the hepatic cell line HepG2. *Frontiers in nutrition*, 8: 901.
- Pereira-Dutra, F.S., et al. (2019). Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 106(3): 563-580.
- Abbas, A.K., et al. (2015). *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8^a ed.
- Kumar, V., et al. (2018). *Robbins Patologia Básica*. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Alberts, B., et al. (2017). *Biologia Molecular da Célula*. 6.ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- Newton, A.C. (2003). Regulation of the ABC Kinases by Phosphorylation: Protein Kinase C as a Paradigm. *Biochem. J.*, 370 (Pt 2): 361–371. doi:10.1042/BJ20021626
- Newton, A.C. (2009). Lipid Activation of Protein Kinases. *J. Lipid Res.*, 50: S266–S271. doi:10.1194/jlr.r800064-jlr200
- Newton, A.C. (2010). Protein Kinase C: Poised to Signal. *Am. J. Physiology-Endocrinology Metab.*, 298 (3): E395–E402. doi:10.1152/ajpendo.00477.2009
- Mosior, M., Newton, A.C. (1998). Mechanism of the Apparent Cooperativity in the Interaction of Protein Kinase C with Phosphatidylserine. *Biochemistry*, 37 (49): 17271–17279. doi:10.1021/bi981344t
- Pacheco, P., et al. (2002). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *The Journal of Immunology*, 169(11): 6498-6506.
- Li, X., et al. (2016). Quercetin protects mice from ConA-induced hepatitis by inhibiting HMGB1-TLR expression and down-regulating the nuclear factor kappa B pathway. *Inflammation*, 39: 96–106.
- Hao, G.Z., et al. (2016). Rutin inhibits neuroinflammation and provides neuroprotection in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage, possibly through suppressing the RAGE-NF- κ B inflammatory signaling pathway. *Neurochem Res*, 41: 1496–504.

- Tian, C., et al. (2021). Rutin prevents inflammation induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells via conquering the TLR4-MyD88-TRAF6-NF- κ B signalling pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(1): 110-117.
- Assi, A.A., El Sayed, A.M. (1998). Evaluation of the Anti-inflammatory Profile of Quercetin Enhancing its Effects by Beta-Cyclodextrin. *J. Drug Res. Egypt*, 22: 293–320.
- Zhang, M., Swarts, S.G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., et al. (2011). Antioxidant Properties of Quercetin. *Oxygen Transport to Tissue XXXII*. Springer US, 283–289.
- Chen, T.-J., Jeng, J.-Y., Lin, C.-W., Wu, C.-Y., Chen, Y.-C. (2006). Quercetin Inhibition of ROS-dependent and -independent Apoptosis in Rat Glioma C6 Cells. *Toxicology*, 223 (1-2): 113–126. doi:10.1016/j.tox.2006.03.007
- Kim, H., Park, B.-S., Lee, K.-G., Choi, C.Y., Jang, S.S., Kim, Y.-H., et al. (2005). Effects of Naturally Occurring Compounds on Fibril Formation and Oxidative Stress of β -Amyloid. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (22): 8537–8541. doi:10.1021/jf051985c
- Sun, G.Y., Chen, Z., Jasmer, K.J., Chuang, D.Y., Gu, Z., Hannink, M., et al. (2015). Quercetin Attenuates Inflammatory Responses in BV-2 Microglial Cells: Role of MAPKs on the Nrf2 Pathway and Induction of Heme Oxygenase-1. *PloS one*, 10 (10): e0141509. doi:10.1371/journal.pone.0141509
- Sharma, V., Mishra, M., Ghosh, S., Tewari, R., Basu, A., Seth, P., et al. (2007). Modulation of Interleukin-1 β Mediated Inflammatory Response in Human Astrocytes by Flavonoids: Implications in Neuroprotection. *Brain Res. Bull.*, 73 (1-3): 55–63. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.01.016
- Bureau, G., Longpré, F., Martinoli, M.-G. (2008). Resveratrol and Quercetin, Two Natural Polyphenols, Reduce Apoptotic Neuronal Cell Death Induced by Neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.*, 86 (2): 403–410. doi:10.1002/jnr.21503
- Islam, Md Shahazul, et al. (2021). Neuropharmacological effects of quercetin: a literature-based review. *Frontiers in Pharmacology*, 12: 665031.
- Melo, Rossana CN, et al. (2011). Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Light Microscopy: Methods and Protocols*, p. 149-161.