

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alexsander Alves Teixeira

**O PAPEL DO FLAVONOIDE APIGENINA EM UM MODELO *IN VITRO* DA
DOENÇA DE PARKINSON NA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y**

Porto Alegre

2018

Alexsander Alves Teixeira

**O PAPEL DO FLAVONOIDE APIGENINA EM UM MODELO *IN VITRO* DA
DOENÇA DE PARKINSON NA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Porto Alegre
2018

Alexsander Alves Teixeira

**O PAPEL DO FLAVONOIDE APIGENINA EM UM MODELO *IN VITRO* DA
DOENÇA DE PARKINSON NA LINHAGEM CELULAR SH-SY5Y**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Figueiró
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani
Faculdade de Farmácia - UFRGS

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Dedico este trabalho à minha querida avó e à memória de minha mãe. Essa conquista também é fruto da dedicação dessas duas incríveis mulheres.

AGRADECIMENTOS

Fazer ciência é um dos maiores atos de cooperação que a sociedade moderna possui. Cada milímetro de progresso de uma única descoberta de um cientista é o fruto do esforço de centenas de tantos outros. A ciência moderna, necessariamente, exige o funcionamento em comunidade. A ciência nos une, a ciência conecta, a ciência somos nós. Esse trabalho definitivamente não é diferente disso. Cada degrau avançado, tijolo por tijolo, é consequência de todos que, de alguma forma, estiveram presentes nessa longa jornada que vai muito além do TCC propriamente dito. Sejam professores, familiares, colegas, amigos ou companheira, cada um teve um papel fundamental. Por isso, devo minha enorme gratidão às pessoas que seguem abaixo e à tantas outras que fizeram parte disso. Dessa forma, agradeço:

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Pens Gelain, pela confiança e liberdade de crescimento e amadurecimento e ao Prof. Dr. José Cláudio, por ter me conduzido (desde bioquímica-I) a entrar nesse incrível mundo da bioquímica no qual tanto me fascina. A todos colegas do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (CEEEO) do Departamento de Bioquímica que foram peças fundamentais para o meu crescimento. Sem a ajuda de vocês nessa reta final, as coisas teriam sido muito mais difíceis.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Fabrício Figueiró e Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani, por gentilmente estarem dispostos a contribuir com esse trabalho.

À PROPESQ-UFRGS, CNPq e CAPES por permitirem que a pesquisa brasileira perdure mesmo em momentos de grande adversidade política e econômica.

À Ágnis pela compreensão e enorme apoio em todos os momentos dessa jornada desde que estamos juntos. Tu é incrível e me inspira todos os dias.

E por fim, à minha família pelo grande apoio e investimento em mim, mas em especial à minha querida avó e a minha mãe, que de onde estiver, sempre esteve comigo de alguma forma. Tenham certeza, a dedicação gigantesca de vocês duas valeu a pena. Eu amo muito vocês.

“A model is a lie that helps you see
the truth.”

Howard Skipper

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum no mundo. A neuroinflamação crônica, o estresse oxidativo associado a disfunção mitocondrial e a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra são características típicas da fisiopatologia da desordem. Por outro lado, estudos tem sugerido que o uso de compostos bioativos naturais, como a apigenina (APG), podem atenuar tais características fisiopatológicas e a progressão da desordem. O objetivo do estudo foi verificar o papel da APG em modelo *in vitro* da DP. Para isso, foi utilizado um modelo de estudo da DP por meio de dano induzido pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na linhagem celular SH-SY5Y submetida à um protocolo de diferenciação neural de *screening* rápido. Os resultados obtidos sugerem que o modelo apresenta importantes características neurais não observadas em estudos similares. Em todas as situações investigadas, a APG apenas demonstrou atenuar os efeitos sob viabilidade celular quando em co-tratamento com o dano realizado pela 6-OHDA. Dessa forma, a APG não revelou-se como um agente neuroprotetor efetivo neste modelo da DP. Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo a investigar o papel deste fitoterápico em um modelo da DP induzido por 6-OHDA.

Palavras-chave: Apigenina. Fitoterápicos. Doença de Parkinson. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder. Chronic neuroinflammation, oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction and dopaminergic neuron loss in the *substantia nigra* are typical characteristics of the disorder. On the other hand, studies suggest that therapeutic phytochemicals, such as apigenin (APG), may attenuate both physiopathological characteristics and the disorder progression. The aim of the study was to investigate the effects of APG in an *in vitro* model of PD. In order to achieve this, we used a model of 6-hydroxidopamine (6-OHDA) induced damage in the SH-SY5Y cell strain. Cells underwent differentiation into neural cells using a screening protocol. The results indicate that the model presents key characteristics that differ from similar studies in the literature. In every investigated situation, APG seems to solely attenuate the harmful effects to cell viability when administered simultaneously with 6-OHDA. In this sense, our study does not reveal APG as having a neuroprotective effect in this PD model. It is noteworthy that this is the first study to investigate the role of APG in a 6-OHDA induced model of DP.

Keywords: Apigenin. Herbal Medicine. Parkinson Disease. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação estrutural de fitoquímicos e seus principais exemplos.	13
Figura 2 - Estrutura química da apigenina.....	14
Figura 3 - Comparação esquemática dos protocolos de diferenciação celular induzida por ácido retinóico na linhagem celular SH-SY5Y.....	18
Figura 4 - Comparação morfológica representativa entre os tratamentos dos protocolos de diferenciação celular mediada por ácido retinóico	20
Figura 5 - Imagem representativa do imunocontéudo da proteína marcadora neural β III-tubulina nos diferentes tratamentos de diferenciação	21
Figura 6 - Curvas de citotoxicidade de 6-OHDA e APG na linhagem celular diferenciada....	22
Figura 7 - Efeito na viabilidade celular da APG sob os modelos de dano com 6-OHDA.	23

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxi-dopamina
APG	Apigenina
AR	Ácido Retinóico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona Reduzida
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NSE	Enolase neurônio-específica
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SRB	Sulforrodamina
TCA	Ácido Tricloroacético
TH	Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. A DOENÇA DE PARKINSON	11
1.2. APIGENINA E A DOENÇA DE PARKINSON	12
1.3. O MODELO DE ESTUDO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. CULTURA CELULAR.....	17
3.2. TRATAMENTOS	17
3.3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	17
3.4. DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	18
3.5. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (<i>WESTERN BLOTTING</i>).....	19
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	20
4.2. CURVAS DE SENSIBILIDADE DO MODELO DE ESTUDO.....	21
4.3. O PAPEL DA APIGENINA NO MODELO DE ESTUDO.....	22
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	27
APÊNDICE A – LISTA DOS PRINCIPAIS ALIMENTOS COM ALTO CONTEÚDO DE APIGENINA	32
APÊNDICE B – LISTA DE REFERÊNCIAS DA LITERATURA CIENTÍFICA QUE ABORDAM O USO DA APIGENINA EM MODELOS DA DOENÇA DE PARKINSON.	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum do mundo, ficando atrás somente da Doença de Alzheimer. Estima-se que a incidência da DP atinja entre 2% a 3% da população acima de 65 anos de idade. Essa desordem é principalmente definida pelo conjunto de duas importantes características neuropatológicas: 1) a morte de neurônios em uma região do mesencéfalo denominada substância negra e; 2) o depósito intracelular anormal de uma proteína conhecida como alfa-sinucleína, formando agregados fibrilares denominados corpos de Lewy, amplamente utilizados no diagnóstico *post-mortem* da DP (Poewe *et al.*, 2017).

Os sintomas clássicos como a bradicinesia (movimentos lentos), rigidez muscular e tremores são a evidência de uma desordem já bem estabelecida. Diversos outros sintomas não motores como hiposmia, constipação, problemas de sono e depressão podem surgir antecipadamente e são o reflexo de uma complexa etiologia multifatorial e incerta, incluindo fatores genéticos e ambientais (Poewe *et al.*, 2017). Assim como sua etiologia, sua fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida. A morte dos neurônios dopaminérgicos, e consequentemente da disponibilidade do neurotransmissor dopamina, é uma das principais características da desordem e parece estar fortemente relacionado com um estado inflamatório crônico do sistema nervoso central (SNC) (Chen, Zhang and Huang, 2016). Esse estado constante de neuroinflamação encontrado na DP, e em outras doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), conduz a sua progressão por meio da ativação da neuroglia, aumento da citotoxicidade causada por citocinas e o estresse oxidativo (Dias, Junn and Mouradian, 2013).

Estudos têm justamente demonstrado que o estresse oxidativo, como consequência de disfunções mitocondriais, é crucial para o desencadeamento de morte neuronal e na progressão dos sintomas da DP (Dias, Junn and Mouradian, 2013). Isso ocorre visto que neurônios dopaminérgicos nigrais parecem ser mais suscetíveis ao estresse oxidativo por diversos fatores. Entre eles, estão: o grande aporte energético como consequência do elevado número de sinapses (Pissadaki and Bolam, 2013); a grande quantidade de dopamina citosólica, que é altamente instável (Dias, Junn and Mouradian, 2013), e o modo transporte de Ca^{2+} das células (Surmeier *et al.*, 2011).

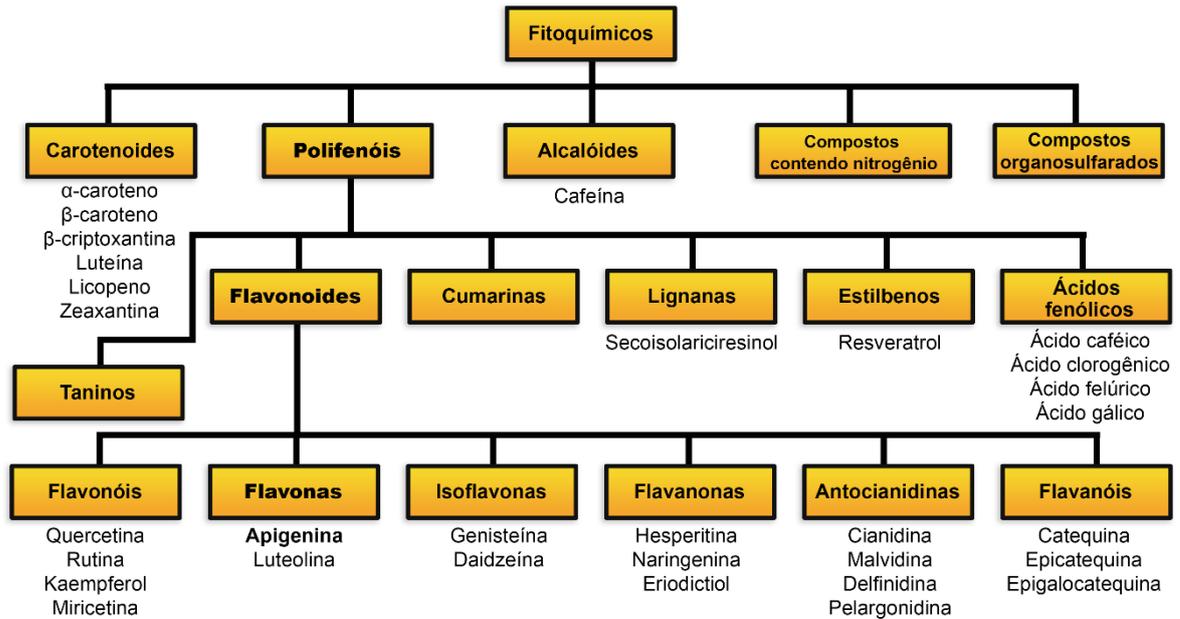
Visto que a dopamina é um neurotransmissor essencial para o funcionamento sináptico adequado do SNC, os tratamentos atualmente disponíveis visam aumentar a disponibilidade

deste neurotransmissor na via nigroestriatal que conecta a substância negra *pars compacta* (SNpc) com o estriado dorsal. Dado que a síntese da dopamina inclui a conversão do seu precursor L-DOPA por meio da atividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no neurônio pré-sináptico, as terapias mais utilizadas incluem a administração desse precursor associado a estratégias como a inibição da sua degradação tanto periférica, quanto na fenda sináptica; a inibição da sua recaptação pelo neurônio pré-sináptico; além do uso de drogas agonistas à dopamina (Poewe *et al.*, 2017). Dessa forma, as estratégias empregadas atualmente são apenas paliativas e por essa razão, alternativas que permitam a redução do risco de ocorrência ou retardamento do progresso da desordem, surgem como alternativas altamente promissoras.

1.2. APIGENINA E A DOENÇA DE PARKINSON

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos amplamente presentes em plantas. A sua função natural como metabólito secundário desses organismos está geralmente associada à defesa de patógenos, predadores e raios UV (Harbone, 1994). São justamente esses compostos, os responsáveis por dar a cor, o sabor, o aroma e a grande complexidade de características presentes nas frutas que estimulam nossos sentidos (Pandey and Rizvi, 2009). Eles são classificados em subgrupos conforme sua estrutura química (Figura 1), como por exemplo, os estilbenos e os flavonoides, que possuem diversas características capazes de influenciar a saúde humana. Confirmando as expectativas, estudos epidemiológicos têm sugerido que antioxidantes e compostos fenólicos presentes na dieta, podem atuar reduzindo o risco, ou ao menos atrasando a progressão, de doenças como a DA e problemas cardíacos (Arts and Hollman, 2005; Graf, Milbury and Blumberg, 2005; Dai *et al.*, 2006). Dessa forma, a fim de compreender melhor a influência de compostos naturais na saúde humana e possibilitar novas terapias, a investigação de compostos isolados tem gerado fortes evidências a favor do uso de fitoterápicos na saúde humana. Como exemplos clássicos, a curcumina e o resveratrol são amplamente conhecidos pelo seu potencial anti-inflamatório (Venigalla *et al.*, 2016) e cardioprotetor (Pandey and Rizvi, 2009), respectivamente. Nesse cenário, um composto conhecido como apigenina (APG), tem demonstrado ser um forte concorrente na corrida por agentes capazes de ampliar a qualidade de vida humana.

Figura 1- Classificação estrutural de fitoquímicos e seus principais exemplos.

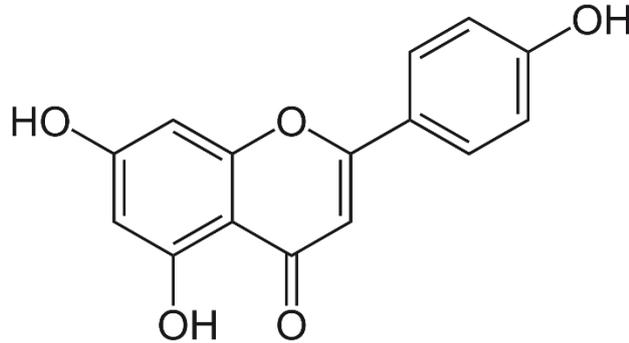


Fonte: adaptado de Liu (2004)

A apigenina (4',5,7-Trihydroxyflavona) (Figura 2) é um flavonoide do subgrupo das flavonas que está amplamente presente em diversos alimentos comuns da cultura humana. Alguns dos exemplos de alimentos mais ricos em apigenina (valores sobre o peso seco) são o aipo chinês (24 mg/100g), a laranjinha Kinkan (21 mg/100g) e a salsa (4503 mg/100g), que possui uma das maiores quantidades encontradas do flavonoide em alimentos (Haytowitz, Wu and Seema, 2018). Diversos outros alimentos também possuem o composto, mas em menor quantidade (APÊNDICE A). Sua estrutura química proporciona à ela uma baixa solubilidade em água de aproximadamente 182 mg/L em 25 °C (US EPA, 2018). Curiosamente, alguns estudos têm demonstrado que a apigenina possui uma biodisponibilidade relativamente boa e consegue transpassar a barreira hematoencefálica, alcançando assim o SNC. Em um estudo realizado, foi constatada a concentração de 1,2 μM de apigenina no cérebro de ratos tratados com doses diárias de 20mg/kg durante uma semana (Popović *et al.*, 2014), abrindo-se assim portas para o estudo do efeito dessa substância na saúde neurológica. Como exemplo disso, alguns outros estudos apontam que o efeito relaxante da camomila pode, ao menos em parte, ser explicado pela presença da apigenina e suas múltiplas formas derivadas (Srivastava, Shankar and Gupta, 2010), visto que são justamente esses compostos os flavonoides mais abundantes da planta e que possuem a capacidade de se ligar a receptores benzodiazepínicos (Viola *et al.*, 1995). Não à toa, estudos apontam que esses flavonoides podem chegar até 5000 mg/100 g em *Matricaria chamomilla* (Hostetler, Ralston and Schwartz, 2017). Além de seus efeitos relaxantes, a apigenina possui múltiplas outras finalidades terapêuticas, como

quimiopreventivo de baixíssima toxicidade em células saudáveis (Madunić *et al.*, 2018) e a modulação do estresse oxidativo e inflamação em diversos modelos de estudo como sepse (Karamese *et al.*, 2016) e de doenças neurodegenerativas (Zhao *et al.*, 2013; Anusha, Sumathi and Joseph, 2017; Nabavi *et al.*, 2018).

Figura 2 - Estrutura química da apigenina.



Um estudo feito por Zhao *et al.* (2013) demonstrou que em um modelo DA, ratos com doses 40mg/kg de apigenina administradas foram capazes de melhorar o aprendizado espacial, restaurar a via neurotrófica ERK/CREB/BDNF, parcialmente reverter os danos a parâmetros oxidativos e reduzir níveis de β -amilóide insolúvel. Resultados similares, que corroboram com a hipótese de que o flavonoide pode atuar na neuroproteção dessa desordem, também foram demonstrados em modelos *in vitro* da DA (Wang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Balez *et al.*, 2016). Interessantemente, a DA e a DP possuem diversas características neuropatológicas em comum, como por exemplo, a neuroinflamação crônica, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, acúmulo de agregados proteicos danosos e a morte neuronal (Yan, Wang e Zhu, 2013; Chen, Zhang e Huang, 2016). Dessa forma, o uso terapêutico da apigenina como agente capaz de prevenir ou reduzir a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas como a DP, é altamente promissor. No entanto, ainda existem poucos estudos que investiguem o papel da apigenina em modelos da DP e cabe a novos estudos elucidar melhor o papel desse flavonoide, tanto nessa, quanto em outras desordens do SNC.

1.3. O MODELO DE ESTUDO

A fim de se compreender os mecanismos fisiopatológicos da DP, existem amplos modelos de estudos da desordem, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, que permitem mimetizar as suas principais características. Entre as metodologias mais utilizadas, está o uso de substâncias neurotóxicas, como é caso da rotenona, a 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) e a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Essas substâncias neurotóxicas são capazes de desregular múltiplas vias celulares, gerar disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, a morte de neurônios dopaminérgicos e uma potente ativação da microglia

e da neuroinflamação no caso do LPS (Xicoy, Wieringa and Martens, 2017; Kujawska and Jodynis-Liebert, 2018). Entre essas, a 6-OHDA é utilizada como modelo da DP devido a sua grande similaridade com a dopamina que resulta em grande afinidade pelos seus canais de transporte. Dessa forma, a 6-OHDA atua seletivamente em neurônios dopaminérgicos e catecolaminérgicos, causando disfunções mitocondriais, estresse oxidativo e a morte da célula (VAN KAMPEN 2000 e Lopes 2017). Segundo Xicoy, Wieringa e Martens (2017), a 6-OHDA é a segunda neurotoxina mais utilizada para mimetizar a DP na linhagem celular SH-SY5Y. Dessa forma, modelos *in vitro*, como a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, estão entre os modelos mais utilizados na investigação de doenças neurodegenerativas. Entre as vantagens da utilização de linhagens celulares, está o baixo custo em relação ao modelo animal, a utilização de linhagens baseadas em DNA humano, a minimização dos problemas éticos e um ambiente altamente controlado que propicia a investigação de mecanismos moleculares, tanto da fisiopatologia da desordem, como da atuação de fármacos e compostos. Por outro lado, o estudo de revisão feito por Xicoy, Wieringa e Martens (2017) demonstrou que, de 962 estudos que utilizaram a linhagem celular SH-SY5Y como modelo da DP, 81,5% haviam utilizado a linhagem não diferenciada, ou seja, na forma de célula proliferativa. Protocolos de diferenciação celular, como por exemplo, o uso de ácido retinóico (AR) derivado da vitamina A, propiciam alterações da morfologia celular, além do aumento de importantes marcadores neurais como enolase neurônio-específica (NSE), tirosina-hidroxilase (TH) e β III-tubulina e portanto, propiciam um interessante modelo celular com características catecolaminérgicas (Lopes *et al.*, 2010; Kunzler *et al.*, 2017). Dessa forma, a diferenciação celular permite a indução de alterações de um fenótipo oncogênico, para um fenótipo do tipo neurônio, com a expressão de uma ampla gama de características de células neurais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da apigenina em um modelo *in vitro* de Doença de Parkinson na linhagem celular SH-SY5Y submetida a protocolo de diferenciação neural.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar o protocolo de diferenciação da linhagem celular SH-SY5Y mediada por ácido retinóico para avaliação de viabilidade em *screening* de substâncias neuroprotetoras e validá-lo por meio de microscopia e imunomarcadores de células neurais.
- Investigar possíveis efeitos neuroprotetores do pré-tratamento com apigenina na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada e desafiada ao dano causado pela exposição à neurotoxina 6-hidroxidopamina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURA CELULAR

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y obtidas da European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). As células foram mantidas em meio de cultura celular DMEM/F12 (1:1) da marca Sigma-Aldrich (#56498c) suplementado com antibiótico-antimicótico (Penicilina 100 Unidades/ml; estreptomicina 100 µg/ml), 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2,44 g/L de bicarbonato de sódio e mantidas em incubadora com temperatura (37°C) e CO₂ (5%) controlados.

3.2. TRATAMENTOS

Preparo e administração da 6-hidroxidopamina: devido à grande instabilidade e auto-oxidação rápida do composto, a 6-OHDA (Sigma-Aldrich) foi pesada e preparada no momento de sua utilização. Dessa forma, o preparo da solução de trabalho consiste na dissolução de 25 mg do composto em uma solução de ácido ascórbico 0,1% em solução salina. Após isso, a droga é diluída no meio de cultura na concentração indicada e os tratamentos são realizados pelo tempo total de 24 horas.

Preparo e administração da solução de estoque da apigenina (APG): foi preparada uma solução estoque de APG (Sigma-Aldrich) na concentração de 30 µM dissolvendo o composto no solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) e então diluído no meio de cultura celular a fim de se atingir a concentração final desejada. Todos os tratamentos seguiram os tempos de 30 e 60 minutos ou 24 horas.

Todos os reagentes utilizados foram filtrados por meio de filtros de membrana de 0.2 µm antes da administração na cultura celular a fim de evitar possíveis contaminações e foram administradas em meio DMEM/F12 com 1% SFB.

3.3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

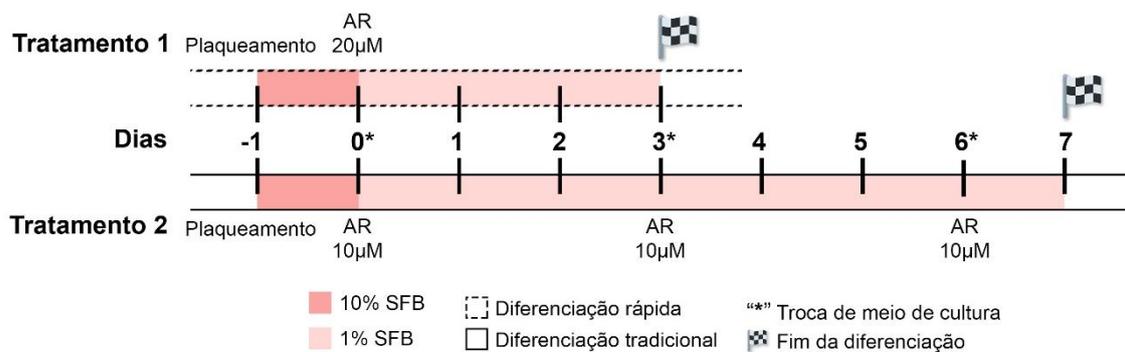
Para a análise de viabilidade e citotoxicidade celular foram utilizados os métodos de incorporação de sulforrodamina B (SRB) e o ensaio da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação. Conforme descrito por Vichai e Kirtikara (2006), o ensaio da incorporação de SRB consiste na ligação de grande afinidade da SRB a componentes proteicos de células aderentes quando em meio ácido. Para isso, as células são fixadas com uma solução de 15% de ácido tricloroacético (TCA), em seguida secas a temperatura ambiente e incubadas com uma solução de SRB 0,4% em ácido acético por 30 minutos em temperatura ambiente. O excesso é removido por 4 lavagens de ácido acético e o

corante aderido às células é ressolubilizado em uma solução de 10 mM de Tris base. O resultado é observado por espectrofotometria no comprimento de onda de 515 nm e os resultados são expressos em porcentagem (%) do controle (Vichai and Kirtikara, 2006). Já o ensaio da quantificação da enzima LDH, consiste em mensurar a LDH, responsável pela conversão de piruvato a lactato com a oxidação de NADH, quando liberada no meio extracelular por lise da membrana celular (Korzeniewski e Callewaert, 1983; Decker e Lohmann-Matthes, 1988). Para isso, o sobrenadante removido das placas de cultura é misturado aos reagentes do kit comercial LDH Liquiform (Labtest SA) conforme indicações do fabricante. A atividade cinética do decaimento de NADH é mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda de 340nm e o resultado foi expresso em porcentagem (%) do controle.

3.4. DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para execução dos protocolos de diferenciação celular, seguiu-se a metodologia já descrita na literatura (Lopes *et al.*, 2010; Kunzler *et al.*, 2017) com alterações pontuais. Resumidamente, as células são semeadas em placas de 6 ou 96 poços com densidade celular entre 15 e 20 mil células/cm² em meio de cultura DMEM/F12 com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio de cultura é trocado por DMEM/F12 com 1% de SFB e 10 µM de ácido retinóico (AR) para a diferenciação tradicional de sete dias e 20 µM para a diferenciação rápida de três dias. No protocolo de diferenciação rápida, as células são mantidas até o terceiro dia, no qual iniciam-se os tratamentos. Para a diferenciação tradicional, o meio é renovado no terceiro e sexto dia da diferenciação (Figura 3).

Figura 3 - Comparação esquemática dos protocolos de diferenciação celular induzida por ácido retinóico na linhagem celular SH-SY5Y.



Acima, na linha tracejada, o “Tratamento 1” representa o protocolo de diferenciação rápida medida pelo tratamento de 20 µM de AR pelo total de três dias. Abaixo, na linha contínua, o “Tratamento 2” representa o protocolo de diferenciação tradicional mediada pelo tratamento de 10 µM de AR pelo total de sete dias com a troca de meio para renovação do AR a cada três dias. Ambos protocolos utilizam redução da concentração de SFB para 1%.
 Fonte: autoria própria (2018).

3.5. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (*WESTERN BLOTTING*)

Por meio da técnica de Western Blotting, é possível detectar proteínas de interesse de um homogeneizado de células. Para isso, as células foram lisadas em tampão Laemmli 4X (250mM Tris, 8% SDS, 40% glicerol e 0,002% azul de bromofenol, pH 6,7), vigorosamente agitadas em um agitador vortex e fervidas por dez minutos à 100C°. Então, as amostras foram adicionadas ao gel de poliacrilamida 10% e suas proteínas separadas por eletroforese para então ser transferidas à uma membrana de nitrocelulose. A eficiência da separação e transferência é verificada por meio do corante Ponceau S. Após isso, as membranas são lavadas em TBS-T (*Tris-buffered saline-Tween-20* - Tris 100 mM, pH 7.5, 0.9% NaCl e 0.1% Tween-20) e o bloqueio da membrana é realizado com uma solução de 5% de BSA (albumina de soro bovino) em TBS-T. As membranas bloqueadas são lavadas novamente e após o bloqueio são incubadas com o anticorpo primário adequado por 15 horas (*“overnight”*) à 4°C. Foram utilizados anticorpos primários para as proteínas β III-tubulina (Cell Signalling - Ref. #4456) e β -Actina (Sigma-Aldrich Ref. #A1978) e posterior incubação por uma hora do anticorpo secundário associado à peroxidase (Sigma-Aldrich Ref. #AP124P). Todos os anticorpos foram diluídos conforme a indicação do fabricante. A detecção da quimioluminescência foi realizada utilizando o Kit Westar Nova 2.0 (Cyanagen - XLS071,0250) e fotodocumentador (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

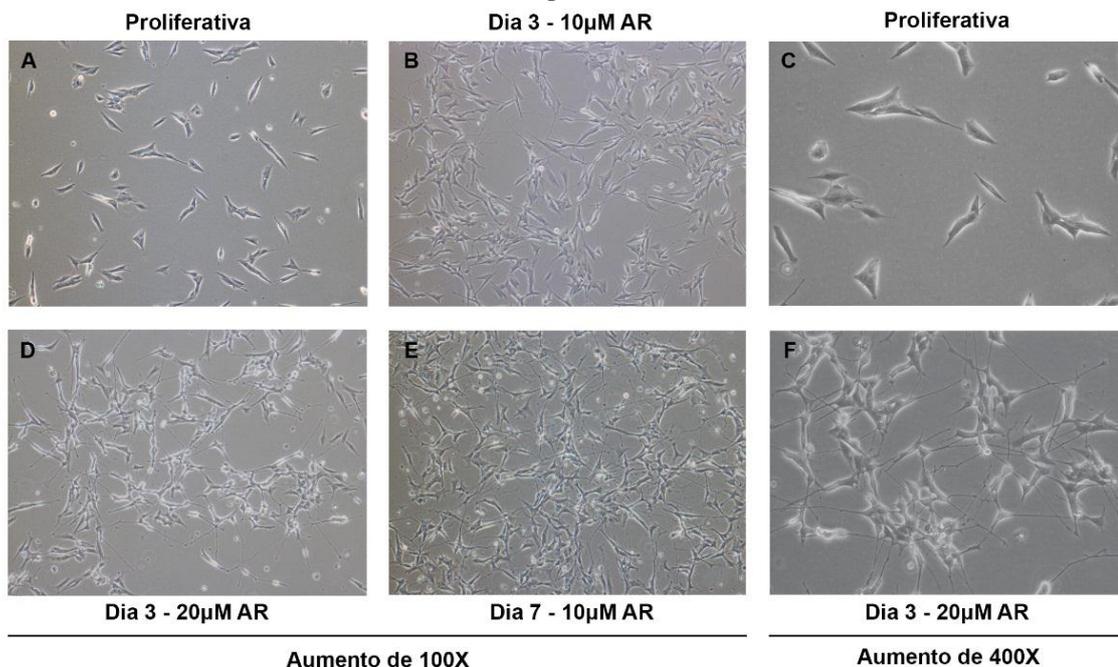
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prism versão 5 e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via e posteriormente comparados com o controle pelo teste de Dunnett nas curvas de 6-OHDA e APG, e entre si pelo teste de Tukey nos demais ensaios. Os dados foram expressos pela média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A fim de comparar os protocolos de diferenciação celular e a viabilidade da diferenciação rápida, as células da linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram induzidas à diferenciação por meio da administração de AR 10 μM e 20 μM seguindo o protocolo já descrito na literatura (Lopes *et al.*, 2010; Kunzler *et al.*, 2017) com adaptações pontuais (Figura 3) a fim de padronizar o protocolo de diferenciação rápida. Após a indução da diferenciação celular, as células apresentaram redução das taxas de proliferação (dados não exibidos) quando comparadas ao grupo não diferenciado e aumento de projeções celulares típicas de neurônios, o que foi verificado por meio de microscopia de contraste de fase (Figura 4). Por outro lado, a linhagem não diferenciada apresentou morfologia que se assemelha à de células epiteliais. Ambos os grupos expostos aos protocolos de diferenciação apresentaram prolongamentos celulares evidentes, tanto na diferenciação rápida de três dias com 20 μM de AR, quanto nos dias três e sete da diferenciação tradicional à 10 μM .

Figura 4 - Comparação morfológica representativa entre os tratamentos dos protocolos de diferenciação celular mediada por ácido retinóico

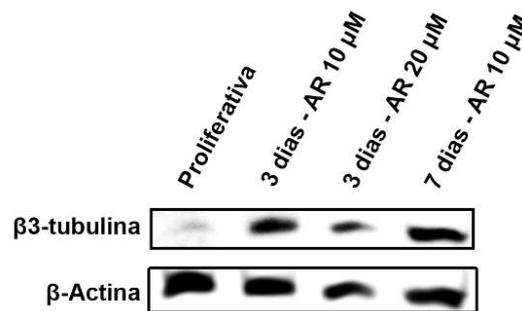


A linhagem celular SH-SY5Y não diferenciada em seu estado proliferativo (A e C), sob o protocolo de diferenciação rápida (D e F) e diferenciação tradicional (B, E) foi registrada por meio do uso de microscopia de contraste de fase.

A β III-tubulina é uma proteína componente de microtúbulos amplamente encontrada em células de origem neural e por essa razão, é utilizada como um marcador para esse tipo celular (Katsetos *et al.*, 2003). Dessa forma, utilizando a técnica de *Western Blotting*, foi

possível verificar o conteúdo da proteína β III-tubulina (Figura 5) que demonstrou estar evidentemente baixo nas células não diferenciadas. Por outro lado, houve um aumento proeminente da expressão dessa proteína nas culturas celulares expostas a ambos protocolos de diferenciação celular. No entanto, visto que este experimento possui o caráter de experimento piloto (n=1 por grupo), não foi possível realizar a quantificação correspondente. Portanto, todos os experimentos seguintes utilizaram o protocolo de diferenciação rápida de três dias.

Figura 5 - Imagem representativa do imunoc conteúdo da proteína marcadora neural β III-tubulina nos diferentes tratamentos de diferenciação

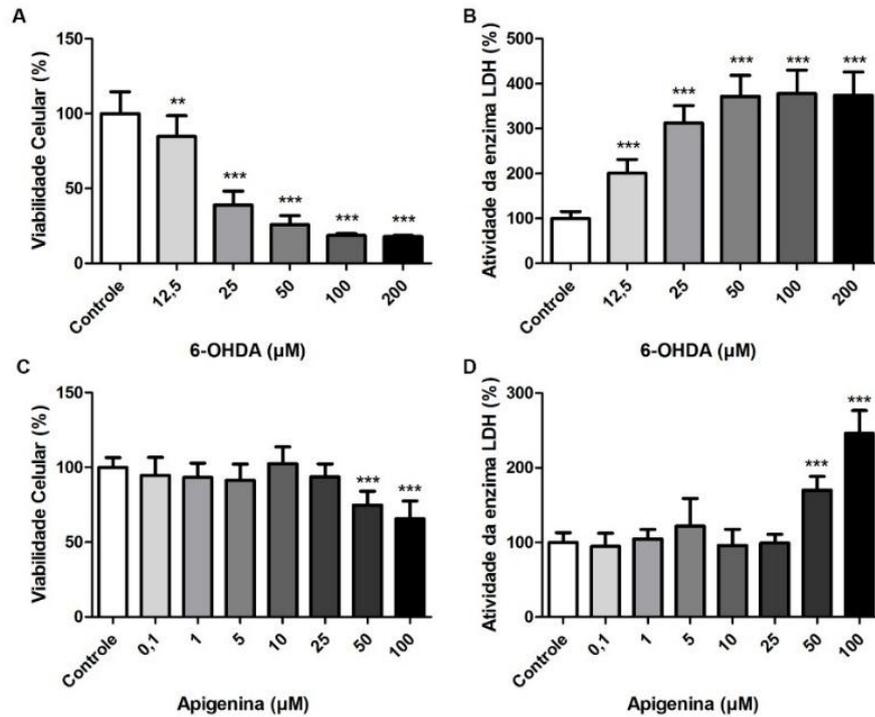


Acima, o conteúdo da expressão da proteína β III-tubulina do homogeneizado celular nos diferentes protocolos de diferenciação foi analisado por meio da técnica de *Western Blot*, n=1. Abaixo, a proteína β -actina é utilizada apenas como controle do conteúdo proteico, visto que sua expressão é constante independentemente do tratamento.

4.2. CURVAS DE SENSIBILIDADE DO MODELO DE ESTUDO

A curva de dano da 6-OHDA foi realizada com as concentrações de 12,5 à 200 μ M por 24 horas nas células SH-SY5Y diferenciadas por três dias com 20 μ M de AR (Figura 6). Dessa forma, foi possível observar a sensibilidade e a relação dose-dependente do modelo exposto à neurotoxina por meio tanto do ensaio da incorporação de SRB, quanto da liberação da LDH (Figura 6A e 6B).

Figura 6 - Curvas de citotoxicidade de 6-OHDA e APG na linhagem celular diferenciada



A curva de dano da 6-OHDA foi realizada com concentrações de 12,5 à 200 μM por 24 horas nas células SH-SY5Y diferenciadas sob o protocolo de diferenciação rápida (A e B) e a viabilidade e citotoxicidade celular do tratamento foi verificado pelos ensaios da incorporação de SRB (A) e liberação da enzima LDH (B). Da mesma forma, foi realizada a curva de concentração da APG (0,1 à 100 μM) por 24 horas e a viabilidade e citotoxicidade celular foi quantificada pelo ensaio da incorporação SRB (C) e liberação da enzima LDH (D). Os dados são apresentados pela média ± DP. **p < 0,01; ***p < 0,001 em comparação ao grupo controle.

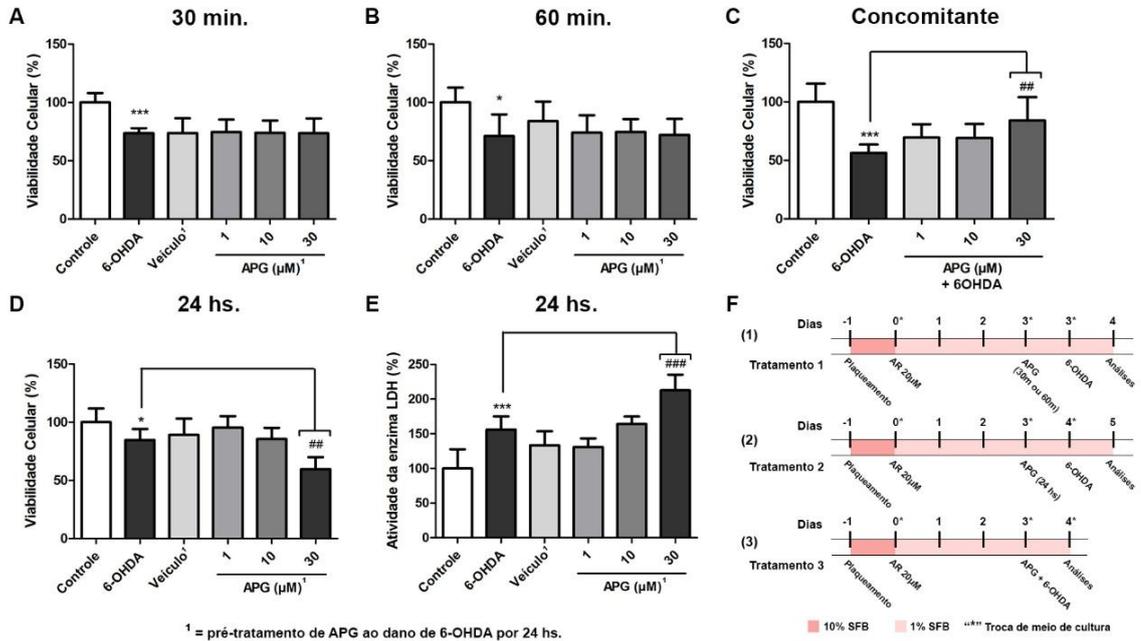
Para investigarmos a sensibilidade do modelo à apigenina (APG), foi realizada uma curva de tratamento por 24 horas abrangendo as principais concentrações utilizadas na literatura (0,1 à 100 μM) (Figura 6C e 6D). Portanto, por meio dos mesmos ensaios de citotoxicidade citados anteriormente, a APG demonstrou alterações significativas na viabilidade celular apenas em concentrações bastante elevadas (50 e 100 μM).

4.3. O PAPEL DA APIGENINA NO MODELO DE ESTUDO

A fim de compreender quais os possíveis cenários em que a APG pode atuar frente ao modelo desafiado à neurotoxina 6-OHDA, pré-tratamentos por 30 minutos, 60 minutos ou 24 horas foram realizados nas concentrações de 1, 10 e 30 μM, assim como um co-tratamento das duas substâncias (Figura 7). Os ensaios de citotoxicidade, nos pré-tratamentos por 30 minutos ou 60 minutos (Figura 7A e 7B), demonstraram não surtir efeitos em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, o pré-tratamento por 24 horas demonstrou efeitos negativos na viabilidade celular na concentração de 30 μM, tanto no ensaio da liberação da LDH, quanto da incorporação da SRB (Figura 7D e 7E). Por outro lado, o co-tratamento utilizando

simultaneamente a 6-OHDA com a APG, demonstrou que a concentração de 30 μ M foi capaz de atenuar significativamente o dano realizado pela 6-OHDA, enquanto as concentrações inferiores (1 e 10 μ M) não obtiveram diferença estatística (Figura 7C).

Figura 7 - Efeito na viabilidade celular da APG sob os modelos de dano com 6-OHDA.



As células diferenciadas foram pré-tratadas com a APG em diferentes concentrações por 30 minutos (A), 60 minutos (B) e 24 horas (D e E) previamente ao dano realizado pela 6-OHDA na concentração de 20 μ M por 24 horas ou concomitantemente (C). Ambas figuras representam o ensaio da incorporação de SRB, com a exceção de (E), que representa o ensaio da liberação da enzima LDH. (F) Esquematização dos desenhos experimentais dos pré-tratamentos realizados por (1) 30 ou 60 minutos (2) 24 horas e (3) concomitantemente ao dano. Os dados são apresentados pela média \pm DP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle e ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em comparação ao grupo 6-OHDA.

5. DISCUSSÃO

Os compostos bioativos naturais da classe dos polifenóis têm sido amplamente investigados para inúmeras neuropatologias, evidenciando um enorme potencial de aplicabilidade para a saúde humana. Na última década, a apigenina (APG) tem demonstrado ser um composto promissor para prevenção de doenças neurodegenerativas. Por outro lado, os possíveis efeitos desse composto em modelos da Doença de Parkinson (DP) apenas foram investigados por pouquíssimos estudos recentes (APÊNDICE B) e seus mecanismos de atuação celular na desordem ainda são pouco conhecidos. A utilização da 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é justamente um dos modelos mais populares da DP e que até então não foi explorado a fim de investigar o papel da APG. Dessa forma, foi possível por meio dos dados obtidos, compreender os possíveis efeitos desse composto em um importante modelo ainda não investigado.

Conforme os dados obtidos, a APG demonstrou não atuar protegendo as células expostas ao dano por 6-OHDA. Em ambos pré-tratamentos, as concentrações de 1 e 10 μM não surtiram efeitos sob parâmetros de viabilidade e citotoxicidade celular em células desafiadas à neurotoxina. Por outro lado, a concentração de 30 μM resultou em um efeito deletério na exposição por 24 horas, sendo esse superior ao dano realizado apenas pela 6-OHDA. Curiosamente, tal resultado vai de encontro ao esperado de acordo com a literatura atual. Modelos da DA *in vitro* têm demonstrado que a APG é capaz de modular a inflamação, a sinalização de Ca^{2+} e as espécies reativas de oxigênio (ERO), além de reduzir a morte celular por apoptose e elevar os sistemas antioxidantes celulares (Wang *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Balez *et al.*, 2016). Já do ponto de vista dos poucos estudos em modelos da DP em cultura celular, as linhagens celulares PC12 (proveniente de *Rattus norvegicus*) e SH-SY5Y (linhagem humana) foram expostas às neurotoxinas MPP⁺ e rotenona, respectivamente, e o efeito do pré-tratamento da APG foi avaliado. Em ambos estudos, o pré-tratamento com o flavonoide amenizou o efeito das neurotoxinas, controlando a morte celular por meio de apoptose (Anusha *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Tal resultado se opõe claramente aos dados aqui evidenciados e pode estar relacionado a inúmeros fatores, tanto do desenho experimental, como das características típicas dos modelos empregados. Desse modo, é importante ressaltar que em alguns dos estudos observados, a metodologia do desenho experimental empregado não é clara. Dessa maneira, o pré-tratamento tanto pode se estender à administração da neurotoxina no mesmo meio de cultura, quanto esse pode ter sido renovado. Em outros, como em Anusha *et al.* (2014) e Wu *et al.* (2015), ao longo do texto fica claro que o pré-tratamento acaba por ora se tornando um co-tratamento no momento da adição do dano no mesmo meio de cultivo

celular. Dessa forma, observa-se não somente a influência do composto na maquinaria celular possibilitando proteção e sim, o efeito da anulação do agente indutor de dano antes mesmo que ele possa causar a disfunção mitocondrial dentro da célula. Isso ocorre visto que tanto a rotenona, a MPP⁺ e a 6-OHDA, são modelos que dependem da geração de ERO para sua funcionalidade (Soto-Otero *et al.*, 2002; Meredith and Rademacher, 2011; Sanders and Timothy Greenamyre, 2013) e compostos flavonoides possuem estruturas químicas que justamente podem atuar como potentes antioxidantes. De tal modo, superestima-se o efeito celular do composto. Tal hipótese é corroborada no experimento realizado em que o tratamento com apigenina foi feito concomitantemente ao dano por 6-OHDA (Figura 7C). Nesse experimento, o grupo co-exposto à 30 μ M APG e a 6-OHDA demonstrou que a apigenina pôde atenuar significativamente o dano da neurotoxina nesse cenário e as concentrações de 1 e 10 μ M possuem a mesma tendência, porém sem significância estatística. De fato, esse comportamento não foi observado quando os tratamentos foram suscetíveis e com a devida troca do meio de cultivo celular, evidenciando-se que os diferentes desenhos experimentais possuem importantes diferenças práticas.

O protocolo de diferenciação celular gerou importantes alterações celulares no modelo de estudo. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com AR alterou tanto a morfologia celular, quanto a expressão de marcadores neurais e pôde assim, alterar suas características para um fenótipo do tipo neurônio. Diversos trabalhos já têm demonstrado que a diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y mediada por AR não apenas aumenta a expressão de importantes proteínas marcadoras neurais como TH e NeuN, mas também propicia alterações funcionais importantes como a redução das taxas de proliferação, e o aumento do conteúdo de dopamina e dos seus transportadores (Lopes *et al.*, 2010, 2017; Kunzler *et al.*, 2017). Dessa forma, o modelo de estudo aqui empregado possui características experimentais importantes que o distinguem consideravelmente dos outros modelos em que a APG fora investigada tanto na DP, quando na DA. Mesmo trabalhos que investigaram o papel de outros flavonoides em modelos de dano com 6-OHDA, como a rutina e a luteolina (que se diferencia da apigenina por apenas uma hidroxila), foram utilizadas linhagens celulares oncogênicas não diferenciadas (Magalingam, Radhakrishnan and Haleagrahara, 2013; Wu *et al.*, 2015).

Portanto, os resultados contrastantes obtidos são, muito possivelmente, um reflexo direto tanto de um modelo de estudo com características distintas e pautadas em uma maior semelhança neural, como do emprego de um desenho experimental que visa uma melhor mimetização da situação patológica. Além disso, a utilização de um agente de dano alternativo do empregado na literatura também pode acarretar em importantes alterações experimentais.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Modelos *in vitro* da DP possuem diversas limitações por serem modelos demasiadamente simplificados, não recriando a real complexidade das interações dos diversos tipos celulares presentes no SNC. No entanto, permitem uma investigação preliminar com um custo muito inferior à pesquisa tradicional com roedores, um ambiente altamente controlado e possibilitam o uso de linhagens baseada em genoma humano. Sendo assim, são uma alternativa bastante interessante para *screenings* rápidos de drogas com potencial terapêutico e investigação de mecanismos de atuação moleculares. Dentro dessa perspectiva, os resultados obtidos sugerem que por mais que a apigenina tenha demonstrado um papel biológico importante em outros modelos de doenças neurodegenerativas, em nosso modelo, o flavonoide demonstrou ser ineficaz como agente neuroprotetor à DP. Até então, nenhum outro estudo publicado havia utilizado seja *in vivo*, ou *in vitro*, o modelo de dano por 6-OHDA para investigar o papel da apigenina em doenças neurodegenerativas.

Como perspectivas futuras, os resultados serão complementados por meio do aumento do número amostral na técnica de *Western Blotting* para que assim possa ser realizada a devida quantificação, além da realização de experimentos necessários para a complementação afim de publicar os resultados. Por outro lado, visto que diversos estudos têm apontado um importante papel da apigenina como fator neurotrófico e indutor de diferenciação neural em células pluripotentes humanas, investigações futuras sobre seus mecanismos poderão ser realizadas. Ainda, o modelo de *screening* por meio do protocolo de diferenciação rápida, será utilizado para investigação de outros compostos com potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS

- Anusha, C. *et al.* (2014) ‘Neuroprotective effects of apigenin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells against rotenone toxicity: A pilot study’, *Drug Invention Today*, 6(1), pp. 6–12.
- Anusha, C., Sumathi, T. and Joseph, L. D. (2017) ‘Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson’s disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis’, *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ltd, 269, pp. 67–79. doi: 10.1016/j.cbi.2017.03.016.
- Arts, I. C. W. and Hollman, P. C. H. (2005) ‘Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies.’, *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl). doi: 10.1093/ajcn/81.1.317S.
- Balez, R. *et al.* (2016) ‘Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer’s disease’, *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep31450.
- CHEN, W.-W., ZHANG, X. and HUANG, W.-J. (2016) ‘Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review)’, *Molecular Medicine Reports*, 13(4), pp. 3391–3396. doi: 10.3892/mmr.2016.4948.
- Dai, Q. *et al.* (2006) ‘Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer’s Disease: The Kame Project’, *The American Journal of Medicine*, 119(9), pp. 751–759. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.045.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M. L. (1988) ‘A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity’, *Journal of Immunological Methods*, 115(1), pp. 61–69. doi: 10.1016/0022-1759(88)90310-9.
- Dias, V., Junn, E. and Mouradian, M. M. (2013) ‘The role of oxidative stress in parkinson’s disease’, *Journal of Parkinson’s Disease*, 3(4), pp. 461–491. doi: 10.3233/JPD-130230.
- Graf, B. A., Milbury, P. E. and Blumberg, J. B. (2005) ‘Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence’, *Journal of Medicinal Food*, 8(3), pp. 281–290. doi: 10.1089/jmf.2005.8.281.
- Harbone, J. B. (1994) *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4th Editio. Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-03518-1>.
- Haytowitz, D. B., Wu, X. and Seema, B. (2018) *USDA database for the flavonoid content of*

selected foods. Release 3.3, Beltsville: US Department of Agriculture. Available at: <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/80400525/Data/Flav/Flav3.3.pdf> (Accessed: 19 November 2018).

Hostetler, G. L., Ralston, R. A. and Schwartz, S. J. (2017) ‘Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity’, *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(3), pp. 423–435. doi: 10.3945/an.116.012948.

Karamese, M. *et al.* (2016) ‘Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of apigenin in a rat model of sepsis: an immunological, biochemical, and histopathological study’, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(3), pp. 228–237. doi: 10.3109/08923973.2016.1173058.

Katsetos, C. D. *et al.* (2003) ‘Class III β -tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology’, *Journal of Child Neurology*, 18(12), pp. 851–866. doi: 10.1177/088307380301801205.

Korzeniewski, C. and Callewaert, D. M. (1983) ‘An enzyme-release assay for natural cytotoxicity’, *Journal of Immunological Methods*, 64(3), pp. 313–320. doi: 10.1016/0022-1759(83)90438-6.

Kujawska, M. and Jodynis-Liebert, J. (2018) ‘Polyphenols in parkinson’s disease: A systematic review of in vivo studies’, *Nutrients*, 10(5). doi: 10.3390/nu10050642.

Kunzler, A. *et al.* (2017) ‘Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress’, *Molecular Neurobiology*, 54(9), pp. 6903–6916. doi: 10.1007/s12035-016-0189-4.

Liu, R. H. (2004) ‘Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action’, *The Journal of Nutrition*, 134(12), p. 3479S–3485S. doi: 10.1093/jn/134.12.3479S.

Liu, W. *et al.* (2015) ‘Protective effects of apigenin against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells’, *International Journal of Molecular Medicine*, 35(3), pp. 739–746. doi: 10.3892/ijmm.2014.2056.

Lopes, F. M. *et al.* (2010) ‘Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies’, *Brain Research*. Elsevier B.V., 1337, pp.

85–94. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.102.

Lopes, F. M. *et al.* (2017) ‘RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells’, *Neurotoxicity Research*. *Neurotoxicity Research*, 31(4), pp. 545–559. doi: 10.1007/s12640-016-9699-0.

Madunić, J. *et al.* (2018) ‘Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties’, *Cancer Letters*, 413, pp. 11–22. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.041.

Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A. and Haleagrahara, N. (2013) ‘Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity’, *International Journal of Molecular Medicine*, 32(1), pp. 235–240. doi: 10.3892/ijmm.2013.1375.

Meredith, G. E. and Rademacher, D. J. (2011) ‘MPTP mouse models of Parkinson’s disease: an update.’, *Journal of Parkinson’s disease*, 1(1), pp. 19–33. doi: 10.3233/JPD-2011-11023.

Miean, K. H. and Mohamed, S. (2001) ‘Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), pp. 3106–3112. doi: 10.1021/jf000892m.

Nabavi, S. F. *et al.* (2018) ‘Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men’, *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 128, pp. 359–365. doi: 10.1016/j.phrs.2017.10.008.

Pandey, K. B. and Rizvi, S. I. (2009) ‘Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), pp. 270–278. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

Patil, S. P. *et al.* (2014) ‘Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice’, *Neuropharmacology*, 86, pp. 192–202. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.07.012.

Pissadaki, E. K. and Bolam, J. P. (2013) ‘The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson’s disease’, *Frontiers in Computational Neuroscience*, 7(March), pp. 1–17. doi: 10.3389/fncom.2013.00013.

Poewe, W. *et al.* (2017) ‘Parkinson disease’, *Nature Reviews Disease Primers*, 3, pp. 1–21. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.

- Popović, M. *et al.* (2014) 'The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats', *Journal of Psychopharmacology*, 28(5), pp. 498–501. doi: 10.1177/0269881113512040.
- Sanders, L. H. and Timothy Greenamyre, J. (2013) 'Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model', *Free Radical Biology and Medicine*, 62(2), pp. 111–120. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003.
- Soto-Otero, R. *et al.* (2002) 'Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants', *Journal of Neurochemistry*, 74(4), pp. 1605–1612. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x.
- Srivastava, J. K., Shankar, E. and Gupta, S. (2010) 'Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future.', *Molecular medicine reports*, 3(6), pp. 895–901. doi: 10.3892/mmr.2010.377.
- Surmeier, D. J. *et al.* (2011) 'The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease', *Neuroscience*, 198(143), pp. 221–231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.045.
- US EPA. [2018]. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Venigalla, M. *et al.* (2016) 'Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Neurochemistry International*, 95(8), pp. 63–74. doi: 10.1016/j.neuint.2015.10.011.
- Vichai, V. and Kirtikara, K. (2006) 'Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening', *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2006.179.
- Viola, H. *et al.* (1995) 'Apigenin, a Component of Matricaria recutita Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects', *Planta Medica*, 61(03), pp. 213–216. doi: 10.1055/s-2006-958058.
- Wang, C. N. *et al.* (2001) 'The Neuroprotective Effects of Phytoestrogens on Amyloid β Protein-induced Toxicity Are Mediated by Abrogating the Activation of Caspase Cascade in Rat Cortical Neurons', *Journal of Biological Chemistry*, 276(7), pp. 5287–5295. doi: 10.1074/jbc.M006406200.

- Wu, P. S. *et al.* (2015) ‘Luteolin and apigenin attenuate 4-hydroxy- 2-nonenal-mediated cell death through modulation of UPR, Nrf2-ARE and MAPK pathways in PC12 cells’, *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0130599.
- Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. M. (2017) ‘The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review’, *Molecular Neurodegeneration*. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.
- Yan, M. H., Wang, X. and Zhu, X. (2013) ‘Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease’, *Free Radical Biology and Medicine*, 62(14), pp. 90–101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014.
- Zhao, L., Wang, J. L., Wang, Y. R., *et al.* (2013) ‘Apigenin attenuates copper-mediated β -amyloid neurotoxicity through antioxidation, mitochondrion protection and MAPK signal inactivation in an AD cell model’, *Brain Research*. Elsevier, 1492, pp. 33–45. doi: 10.1016/j.brainres.2012.11.019.
- Zhao, L., Wang, J. L., Liu, R., *et al.* (2013) ‘Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer’s disease mouse model’, *Molecules*, 18(8), pp. 9949–9965. doi: 10.3390/molecules18089949.

APÊNDICE A – LISTA DOS PRINCIPAIS ALIMENTOS COM ALTO CONTEÚDO DE APIGENINA

Nome popular	Nome científico	Quantidade* (mg/100g)	Referência
Salsa	<i>Petroselinum crispum</i>	4503	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Salsa (crua)	<i>Petroselinum crispum</i>	215	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Semente de aipo	<i>Apium graveolens</i>	78	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Bertalha	<i>Basella alba</i>	62	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Goiabeira	<i>Psidium guajava</i>	57	(Miean and Mohamed, 2001)
Goji-berry	<i>Lycium chinense</i>	54	(Miean and Mohamed, 2001)
Bilimbi	<i>Averrhoa bilimbi</i>	45	(Miean and Mohamed, 2001)
Aipo	<i>Apium graveolens</i>	33	(Miean and Mohamed, 2001)
Pimentão	<i>Capsicum annum</i>	27	(Miean and Mohamed, 2001)
Aipo Chinês	<i>Apium graveolens var. secalinum</i>	24	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Alho	<i>Allium sativum</i>	21	(Miean and Mohamed, 2001)
Quincã / Laranjinha Kinkan	<i>Citrus japonica</i>	21	(Haytowitz, Wu and Seema, 2018)
Couve Chinesa	<i>Brassica oleraceae</i>	18	(Miean and Mohamed, 2001)
Ervilha	<i>Pisum sativum</i>	17	(Miean and Mohamed, 2001)

*Quantidade de apigenina relativa ao peso dos alimentos desidratados, exceto quando citado o contrário.

APÊNDICE B – LISTA DE REFERÊNCIAS DA LITERATURA CIENTÍFICA QUE ABORDAM O USO DA APIGENINA EM MODELOS DA DOENÇA DE PARKINSON.

Modelo	Indução do dano	Efeito da APG*	Concentração / Dose	Referência
SH-SY5Y	Rotenona	↓ Citotoxicidade ↓ Fragmentação DNA	10; 20 e 30 µM	(Anusha <i>et al.</i> , 2014)
PC-12	MPP+	↓ Citotoxicidade ↓ EROs intracelulares ↓ Dano mitocondrial ↓ Apoptose	3; 6 e 12 µM	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
Camundongo	MPTP	↑ TH ↑ BDNF ↑ SOD, CAT, GSH ↓ Inflamação ↓ Peroxidação Lipídica	5; 10 e 20 mg/kg (gavagem)	(Patil <i>et al.</i> , 2014)
Rato	Rotenona	↑ TH ↑ BDNF ↑ SOD, CAT, GST, GSH, GPx, GR ↓ Inflamação ↓ Peroxidação Lipídica	10 e 20 mg/kg (gavagem)	(Anusha, Sumathi and Joseph, 2017)

Conforme os bancos de dados Pubmed, ScienceDirect e Web of Science. *Em relação ao grupo desafiado ao dano.