

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA**

**BERNARDO CAETANO ASSEIN ARÚS**

**EFEITOS DO RESVERATROL FRENTE À DEPLEÇÃO DE GLUTATIONA EM  
CÉLULAS ASTROGLIAIS C6**

**IMBÉ  
2016**

**BERNARDO CAETANO ASSEIN ARÚS**

**EFEITOS DO RESVERATROL FRENTE À DEPLEÇÃO DE GLUTATIONA EM  
CÉLULAS ASTROGLIAIS C6**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: biologia marinha e costeira da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Orientador: Dr. André Quincozes dos Santos  
Co-orientadora: Dra. Larissa Bobermin

**IMBÉ**

**2016**

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo a obra de DA SILVA, L. N. *et al.* **Manual de trabalhos acadêmicos e científicos:** orientações práticas à comunidade universitária da UERGS. Porto Alegre: UERGS, 2010., que segue as normas da ABNT.

#### CIP- Catalogação na Publicação

Arús, Bernardo Caetano Assein  
Efeitos do resveratrol frente à depleção de glutathione em células astrogliais C6 / Bernardo Caetano Assein Arús. -- 2016.  
32 f.

Orientador: André Quincozes dos Santos.  
Coorientadora: Larissa Bobermin.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Estresse oxidativo. 2. Neuroproteção. 3. Células gliais. 4. Potencial farmacológico. I. dos Santos, André Quincozes, orient. II. Bobermin, Larissa, coorient. III. Título.

Adaptado do Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo autor.

**BERNARDO CAETANO ASSEIN ARÚS**

**EFEITOS DO RESVERATROL FRENTE À DEPLEÇÃO DE GLUTATIONA EM  
CÉLULAS ASTROGLIAIS C6**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: biologia marinha e costeira pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. André Quincozes dos Santos  
Co-orientadora: Dra. Larissa Daniele Bobermin

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Gisele Hansel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Fabrício Figueiró  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Coordenador da atividade TCC II – CBM: Prof. Dr. Enio Lupchinski Junior  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

**IMBÉ**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. André Quincozes, por ter me aberto as portas do laboratório, e oportunizado a minha introdução à ciência. Sou imensamente grato pela sua dedicação para ensinar, pelos incentivos e cobranças, bem como pela confiança oferecida. Também agradeço pela amizade que criamos, pelo exemplo de competência, e pela excelente orientação proporcionada no período de IC.

À Larissa Bobermin, não só pela co-orientação, mas também pela confiança, empenho e treinamento. Agradeço também pela amizade e pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao Prof. Diogo Souza, pelo exemplo, ensinamentos e carinho dispensados.

Aos colegas do Laboratório 28, em especial às excelentes Débora, Bruna, Camila e Priscila, pelo acolhimento, e pela ampla gama de ensinamentos: a primeira pipetagem, ensaios bioquímicos, análise de dados, aspectos éticos, e muito mais.... Agradeço também pela amizade e agradável companhia que fizeram os dias no laboratório produtivos e agradáveis.

Ao Prof. Marcelo Dietrich, pela oportunidade de estágio, pelo exemplo de competência e pelo auxílio científico. Também agradeço aos membros do seu laboratório em Yale, Marcelo Zimmer, JP e Jeremy, pelo acolhimento, treinamento e incentivo.

Aos colegas do Dietrich SeedLab, Rafael, Roberta e Leticia, pela seriedade, engajamento e companheirismo para iniciar este novo projeto.

À UFRGS, extensível à UERGS, pelo ensino superior gratuito de qualidade, assim como aos seus professores e funcionários, pela cordialidade e auxílio durante a graduação.

Aos estimados Neusa e Elias, por proporcionarem a mais confortável acomodação durante o período em Imbé.

Aos queridos Marco e Fabiano pela companhia, amizade e coleguismo desfrutados ao longo da graduação.

Aos meus amigos de longa data, Larissa e Arthur, não só pelo ombro amigo, mas também pela compreensão nos meus momentos de ausência.

Ao Diogo, pelo imensurável apoio e exemplo nesta incipiente trajetória científica. Agradeço também pelo carinho e por todo o suporte oferecido no âmbito pessoal.

À Fernanda, agradeço pela parceria, companhia e carinho nesta caminhada, e também pela compreensão, apoio e afeto oferecidos nos momentos complicados.

À minha família, em especial aos meus avós, Marta, Moacir (em saudosíssima memória), Gláucia e Renato – a “ONG Caetano-Arús” –, que estiveram incondicionalmente presentes na minha formação como pessoa e acadêmico, bem como à tia Nádia, por todo o amor e suporte oferecidos em todos os momentos.

Aos meu pequenos e amados irmãos, Gabriel, Clara e Violeta, pelo enorme carinho e por proporcionarem imensa satisfação nos momentos em família.

E, por fim, aos meus pais, Rossana e Samir, que proporcionaram toda a base para o meu desenvolvimento e sempre investiram para que eu tivesse a melhor educação, sou grato pelo carinho, afeto, dedicação e apoio incondicionais concedidos ao longo de toda a minha vida.

“A ciência progride de duas maneiras:  
adicionando fatos novos e simplificando os existentes...”

Claude Bernard (1813 – 1878)

## RESUMO

O polifenol resveratrol, uma fitoalexina predominantemente encontrada em uvas e no vinho tinto, apresenta inúmeros efeitos biológicos, por exemplo a ação antioxidante e anti-inflamatória. No sistema nervoso central (SNC), o resveratrol exibe efeitos neuroprotetores em vários modelos experimentais de doenças neurológicas, como epilepsia, isquemia e doenças de Parkinson e Alzheimer. A ação protetora do resveratrol pode ocorrer por meio da modulação de vias de sinalização como a heme oxigenase 1 (HO-1), pelo ataque direto a radicais livres, e também pela modulação e potencialização de defesas antioxidantes celulares, como a glutathiona (GSH), a principal molécula antioxidante do SNC, cuja síntese está diretamente associada aos astrócitos. Sabe-se que a depleção de GSH em células gliais com D,L-butionina sulfoximina (BSO) gera estresse oxidativo, com aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, este trabalho investiga o efeito glioprotetor do resveratrol frente à depleção de GSH induzida por BSO em células astrogliais C6, sobre parâmetros oxidativos e inflamatórios, bem como o mecanismo celular envolvido em tal proteção. As células foram tratadas com 5 mM de BSO por 24 h, na presença ou ausência de pré-tratamento com resveratrol (100  $\mu$ M) por 1 h. Nos experimentos em que o papel da HO-1 foi investigado, as células foram pré-incubadas por 30 min com protoporfirina zínica IX (ZnPP IX), um inibidor seletivo desta via. Após, foram avaliados a viabilidade celular, o conteúdo intracelular de GSH, a produção de EROs, bem como os níveis das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Como esperado, a exposição ao BSO reduziu a concentração intracelular de GSH e aumentou a produção de EROs, bem como a secreção das citocinas pró-inflamatórias. Estes efeitos, no entanto, foram abolidos quando as células foram pré-incubadas com resveratrol. Estes resultados sugerem que o resveratrol atenua a citotoxicidade do BSO, através da ativação da biossíntese de GSH, via HO-1. Dessa forma, nossos dados reforçam o papel antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol.

**Palavras-chave:** resveratrol, glutathiona, D,L-butionina sulfoximina (BSO), células astrogliais, estresse oxidativo, resposta inflamatória, heme oxigenase 1 (HO-1)

## ABSTRACT

The polyphenol resveratrol, a phytoalexin mainly found in grapes and red wine, displays protective properties when exposed to both oxidative and inflammatory conditions. In the central nervous system (CNS), resveratrol exhibits neuroprotective effects in several neurological disorders experimental models, *e.g.*, epilepsy, stroke, Parkinson's and Alzheimer's diseases. Resveratrol can exert its protective activity by modulating signaling pathways, such as the heme oxygenase 1 (HO-1) system, the glutathione (GSH) antioxidant system, as well as acting as a direct scavenger of free radicals. GSH is the CNS primary antioxidant molecule, and its biosynthesis is straightforwardly associated with astrocytes. Glial GSH depletion with D,L-buthionine-sulfoximine (BSO) is known to generate oxidative stress and subsequent pro-inflammatory cytokine release. Therefore, this study sought to investigate the gliopreventive effects of resveratrol against BSO-induced GSH depletion in C6 astroglial cells, on oxidative and inflammatory parameters as well as its underlying cellular mechanism. Cells were treated with BSO 5 mM for 24 h, in the presence or absence of pre-treatment with resveratrol 100  $\mu$ M for 1 h. Cells were also pre-incubated for 30 min with ZnPP IX, a selective inhibitor of the HO-1 pathway, when the role of this pathway was investigated. Then, we assessed the following: cell viability, GSH intracellular content, reactive oxygen species (ROS) production, and the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  levels. As expected, BSO exposure reduced intracellular GSH concentration, and increased ROS production as well as the pro-inflammatory mediators' release. These effects, however, were reversed in resveratrol-treated cells. These results suggest that resveratrol mitigates BSO cytotoxicity through the activation of GSH biosynthesis, with participation of the HO-1. Thus, we present data that strengthen the antioxidant and anti-inflammatory roles of resveratrol.

**Keywords:** resveratrol, glutathione, D,L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO), astroglial cells, oxidative stress, inflammatory response, heme oxygenase 1 (HO-1)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento de resposta antioxidante; do inglês, “antioxidant element response”
BSO	D,L-butionina sulfoximina
DCFH	Diclorofluoresceína
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco; do inglês, “ <i>Dulbecco’s modified Eagle medium</i> ”
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCL	glutamato cisteína ligase
GSH	glutathiona
HBSS	Solução salina balanceada de Hank’s
HO-1	heme oxigenase 1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
LDH	Lactato desidrogenase
MTT	Brometo de metiltiazol dissulfil tetrazólio
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PBS	Tampão fosfato-salino
IP	Iodeto de propídio
RSV	Resveratol
SFB	Soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa; do inglês, “ <i>tumor necrosis factor</i> ”
x <sub>c</sub> <sup>-</sup>	Trocador cistina/glutamato
$\gamma$ -gluCys	$\gamma$ -glutamilcisteína
ZnPP IX	protoporfirina zíncica IX

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	15
2.1	REAGENTES	15
2.2	CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTOS COM RESVERATROL E BSO	15
2.3	VIABILIDADE CELULAR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA	16
2.4	CONTEÚDO DE GSH	16
2.5	CAPTAÇÃO DE CISTINA	17
2.6	OXIDAÇÃO DE DCFH	17
2.7	NÍVEIS DE TNF $\alpha$ E IL-1 $\beta$	18
2.8	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA	18
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	19
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	23
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	27
	<b>REFERÊNCIAS</b>	28

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) é constituído pelo encéfalo (tronco encefálico, cerebelo e cérebro) e pela medula espinhal, sendo esta a porção que segue no interior da coluna vertebral, e aquele protegido pela caixa craniana (LENT, 2010). Duas classes celulares principais compõem o tecido nervoso central, os neurônios (células nervosas) e as células da glia. Ainda, as células gliais são divididas em dois grandes tipos celulares: microglia e macroglia, sendo que esta última inclui os oligodendrócitos e os astrócitos (KANDEL *et al.*, 2000). Observa-se que a compreensão da estrutura do tecido nervoso somente foi possível após as descrições detalhadas das células nervosas por Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal, no final do século XIX (KANDEL *et al.*, 2000).

Historicamente, acreditava-se que o papel dos astrócitos era meramente estrutural, com a função de sustentação mecânica para os neurônios (LENT, 2010); o próprio termo “glia” (do grego, “cola”) deriva da função de suporte creditada a esta classe celular quando da sua descoberta (RAMÓN Y CAJAL, 1995; KANDEL *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que as funções destas células vão além da estrutural, de modo que os astrócitos são considerados o terceiro elemento da sinapse devido à sua ação como moduladores da atividade sináptica, bem como ao seu papel na liberação e reciclagem de neurotransmissores e no tamponamento de íons potássio resultantes da atividade sináptica (BELANGER; MAGISTRETTI, 2009; PEREA *et al.*, 2014). A cultura de células astrogliais da linhagem C6 tem sido amplamente utilizada como modelo de estudo das funções astrocitárias, bem como das vias de sinalização que ocorrem neste tipo celular. Apesar do método *in vitro* não representar a célula no seu ambiente complexo, diversas informações de extrema relevância têm sido obtidas a partir de estudos de culturas astrogliais, sendo algumas capazes de serem aplicadas *in vivo*, em especial, mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo do glutamato (ESCARTIN *et al.*, 2011; QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011; BENEDIKTSSON *et al.*, 2012).

Além do seu papel no metabolismo e homeostase do SNC, a importância das células astrogliais também reside na sua atividade protetora diante de condições patológicas ou de dano, função que é ressaltada, por exemplo, devido aos efeitos destas células sobre o metabolismo do sistema antioxidante da glutathiona (GSH) – o

principal antioxidante do SNC (HERTZ; ZIELKE, 2004; MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006; KHAKH; SOFRONIEW, 2015). A síntese glial de GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glutamato, cisteína e glicina, é destacada devido à peculiaridade destas células possuírem o trocador de cistina/glutamato ( $x_c^-$ ), que possibilita a incorporação de cistina extracelular, bem como à sua capacidade de reduzir este aminoácido a cisteína (HERTZ; ZIELKE, 2004; SEIB *et al.*, 2011). Este processo ocorre mediante a participação de duas enzimas: a) glutamato-cisteína ligase (GCL), responsável pela produção do dipeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GluCys), a partir da ligação entre cisteína e glutamato; e b) glutatona sintetase, que catalisa a reação desse dipeptídeo com uma molécula de glicina, formando o tripeptídeo GSH (ESCARTIN *et al.*, 2011; AOYAMA; NAKAKI, 2015). Observa-se que a disponibilidade de cisteína é um fator limitante para a atividade da GCL, e, portanto, para a síntese de GSH (LU, 2009; FERGUSON; BRIDGE, 2016). Neste sentido, o composto farmacológico D,L-butionina sulfoximina (BSO) inibe seletivamente a GCL, resultando no bloqueio direto da síntese astrocítica de GSH (LU, 2009; LEE *et al.*, 2010). O BSO tem sido utilizado como modelo de estresse oxidativo em tecidos tanto centrais quanto periféricos; desta forma, Lee e cols. (2010) propuseram um modelo de neurotoxicidade em cultura de células gliais baseado na depleção de GSH, capaz de induzir estresse oxidativo e neuroinflamação após o tratamento com BSO.

O estresse oxidativo é a condição resultante do desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante, em favor do primeiro (HALLIWELL, 2006). Neste estado, os níveis intracelulares de GSH podem estar reduzidos, ao passo que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é aumentada, levando a potencial dano celular (DRINGEN, 2000; DRINGEN; HIRRLINGER, 2003). A neuroinflamação, por sua vez, refere-se à produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), por astrócitos e células microgliais, além de produção de EROs, frente a condições de dano (TANABE *et al.*, 2010; SANTELLO *et al.*, 2011). Esta circunstância está associada a doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica, e doenças de Huntington, Parkinson e Alzheimer (HENEKA *et al.*, 2014; OLMOS; LLADO, 2014). Diversos tratamentos têm sido propostos para amenizar os efeitos dessas doenças, ou mesmo para preveni-las. Conseqüentemente, a descoberta de moléculas com potencial terapêutico no SNC é de destacada relevância.

O resveratrol, um polifenol naturalmente produzido por diversas espécies de vegetais que compõem a nossa dieta, como uvas, amendoins e frutas vermelhas, tem sido amplamente estudado devido a suas diversas atividades biológicas, dentre as quais se destacam as ações antioxidante e anti-inflamatória (BAUR; SINCLAIR, 2006; ALBANI *et al.*, 2010; BASTIANETTO *et al.*, 2015). Esta molécula foi descoberta quando isolada das raízes da herbácea oriental *Veratrum grandiflorum* O. Loes em 1942, porém somente a partir de 1992 o resveratrol ganhou reconhecido interesse científico, após a proposição de que este seria uma das explicações para os benefícios cardioprotetores do vinho tinto (BAUR; SINCLAIR, 2006).

A ação antioxidante do resveratrol ocorre mediante a neutralização direta de radicais livres, mas mais expressivamente pela modulação e potencialização de defesas celulares antioxidantes e vias de sinalização celular (RICHARD *et al.*, 2011; BASTIANETTO *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2016). Além disso, o resveratrol tem sido reportado como agente protetor em outras condições, possuindo atividades anti-inflamatória, antienvhecimento, cardioprotetora, e antitumoral (VANG *et al.*, 2011; VARONI *et al.*, 2016). Mais especificamente quanto ao SNC, foram observados efeitos neuroprotetores do resveratrol em modelos experimentais de isquemia, epilepsia e doenças de Parkinson e Alzheimer, dentre outros distúrbios neurodegenerativos (e.g. REGE *et al.*, 2014). Os efeitos protetores do resveratrol são associados, dentre outros fatores, à modulação de enzimas e de vias de sinalização celular relacionadas à resposta ao estresse (XIA *et al.*, 2016). Uma destas vias é a da heme oxigenase 1 (HO-1), que tem sido identificada como um importante mecanismo para explicar o efeito benéfico do resveratrol (SAKATA *et al.*, 2010). A HO-1 é a isoforma induzível da enzima limitante na rota na qual o heme, pró-oxidante, é degradado em biliverdina/bilirrubina, ambas moléculas bem caracterizadas como antioxidantes (WAKABAYASHI *et al.*, 2010; ESCARTIN *et al.*, 2011; BRAMANTI *et al.*, 2012). Nota-se que esta via é modulada pelo fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), o qual também modula a transcrição de outros sistemas antioxidantes importantes, como a GSH e o transportador  $x_c^-$  (WAKABAYASHI *et al.*, 2010; ESCARTIN *et al.*, 2011). Nosso grupo recentemente publicou trabalhos que evidenciam a capacidade do resveratrol de modular os níveis intracelulares de GSH em diversos modelos experimentais com a participação da HO-1 (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2013; BELLAVER *et al.*, 2015).

Esta monografia visa a investigar os potenciais efeitos protetores do resveratrol frente à depleção de GSH farmacologicamente induzida pelo BSO em células astrogliais C6. Adicionalmente, os objetivos específicos deste trabalho foram: 1) avaliar os efeitos do resveratrol sobre parâmetros oxidativos em células astrogliais C6 expostas ao BSO, tais como conteúdo intracelular de GSH, captação de cistina, e produção de EROs; 2) investigar a resposta inflamatória das células C6 decorrente do insulto com BSO, bem como a ação do resveratrol sobre parâmetros inflamatórios, por meio da avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; e 3) analisar as consequências da inibição da HO-1 sobre os efeitos do resveratrol.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES

O meio de cultivo DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle medium*) e demais materiais para cultura de células foram adquiridos da Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos). Por outro lado, 3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno (resveratrol), D,L-butionina sulfoximina (BSO), cistina, ácido homocistéico, brometo de metiltiazol dissulfil tetrazólio (MTT), iodeto de propídio (IP), 2'-7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), protoporfirina zíncica IX (ZnPP IX), solução padrão de GSH e o-ftaldialdeído foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Já [<sup>14</sup>C]-cistina foi comprada de Amersham (Buckingham-shire, Reino Unido). Além disso, todos os outros reagentes de laboratório utilizados para o desenvolvimento desta monografia foram adquiridos de distribuidores comerciais locais.

### 2.2 CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTOS COM RESVERATROL E BSO

As células astrogliais C6 utilizadas como modelo de estudo deste trabalho foram adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, Estados Unidos), e conservadas em nitrogênio líquido. Para realizar o cultivo, as células C6 foram semeadas e mantidas em frascos de cultivo, em DMEM contendo 5% soro fetal bovino (SFB), 2,5 mg/ml Fungizone® (Gibco/Invitrogen, CA, Estados Unidos) e 100 U/l gentamicina, a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram crescimento exponencial, estas foram destacadas do frasco de cultivo utilizando 0,05% tripsina/ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e semeadas (1 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) em placas de 6 ou 24 poços. As células, então, foram mantidas em DMEM (5% SFB), a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem a confluência (no terceiro dia sob as condições *in vitro*).

Após as células C6 atingirem a confluência, trocamos o meio de cultivo para DMEM sem soro, e realizamos a pré-incubação destas células com resveratrol (100 µM) por 1 h (etanol foi usado como veículo). Subsequentemente, adicionamos BSO 5 mM às células, na presença ou ausência de resveratrol, por 6 ou 24 h. Para estudar o

papel da HO-1 sobre os efeitos do resveratrol, as células foram tratadas com ZnPP IX (um inibidor seletivo da HO-1) por 30 min antes dos tratamentos com resveratrol e/ou BSO. Ressaltamos que durante todos os procedimentos as células foram mantidas à temperatura de 37°C, em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

Para efetuar os experimentos, conduzimos da seguinte maneira: para medir a redução de MTT, liberação de lactato desidrogenase (LDH), incorporação de IP, oxidação de DCFH, e captação de cistina, as células foram incubadas com os reagentes específicos para cada método; para avaliar o conteúdo de GSH, as células foram lisadas em tampão fosfato-salino (PBS) com KCl (140 mM); para medir os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o meio extracelular foi utilizado.

### 2.3 VIABILIDADE CELULAR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o ensaio de redução do MTT, que consiste em um teste colorimétrico que mede a capacidade das desidrogenases mitocondriais reduzirem o MTT. Adicionamos MTT à concentração de 50  $\mu$ g/mL ao meio de cultivo ao final dos tratamentos, no qual as células foram incubadas por 30 min a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após, removemos o meio, e dissolvemos os cristais de MTT em dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores de absorbância foram medidos a 560 nm e 650 nm. Os resultados foram expressos como percentuais relativos às condições controle.

Para ensaios de integridade de membrana, adicionamos IP 7,5  $\mu$ M às células, as quais foram então incubadas durante 6 e 24 h a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. A densidade óptica do núcleo de fluorescência (marcada com IP), que indica a perda de integridade de membrana, foi medida com o software Optiquant (Packard Instrument Company). O ensaio de LDH foi realizado a partir de 50  $\mu$ L do meio extracelular utilizando-se um kit colorimétrico comercial (Doles, GO, Brasil). Os resultados foram expressos como percentuais relativos às condições controle.

### 2.4 CONTEÚDO DE GSH

Os níveis de GSH foram avaliados conforme anteriormente descrito por Browne e Armstrong (1998). O lisado de células foi homogeneizado em PBS 20 mM/KCl 140

mM (pH 8,0) contendo EDTA 5 mM. A proteína, por sua vez, foi precipitada com ácido meta-fosfórico 1,7%. O sobrenadante foi incubado com o-ftaldialdeído (à concentração de 1 mg/ml em metanol) a 22°C durante 15 min. Por fim, uma curva-padrão de GSH foi realizada com concentrações variando entre 0 µM a 500 µM. Os comprimentos de onda de 350 nm e 420 nm (excitação e emissão, respectivamente) foram utilizados para determinar a fluorescência, e as concentrações calculadas a partir deste experimento foram expressas em nmol/mg proteína.

## 2.5 CAPTAÇÃO DE CISTINA

Para realizar os experimentos de medida da captação de cistina, seguimos o método previamente descrito por Wegrzynowicz e cols. (2007). As células foram incubadas com solução salina balanceada de Hank's (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl, 5,36 KCl, 1,26 CaCl<sub>2</sub>, 0,41 MgSO<sub>4</sub>, 0,49 MgCl<sub>2</sub>, 0,63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,17 NaHCO<sub>3</sub> e 5,6 glicose, ajustada a pH 7,4. Iniciamos o ensaio com a adição de cistina 100 µM e 0,05 µCi/poço de [<sup>14</sup>C]-cistina, e, após 5 minutos, a incubação foi interrompida mediante a remoção do meio, seguida pela lavagem das células por duas vezes utilizando HBSS em baixa temperatura. As células foram então lisadas em uma solução de NaOH 0,5 M. A radiação incorporada foi medida em um contador de cintilação. A captação de cistina independente de sódio foi medida utilizando-se cloreto de colina, ao invés de NaCl, no HBSS. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína/min.

## 2.6 OXIDAÇÃO DE DCFH

Para avaliar os níveis intracelulares de EROs, utilizamos 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), um composto não fluorescente com capacidade de permeabilidade celular. Assim, adicionamos DCFH-DA 10 µM às células durante 30 min a 37°C. Após esse período, as células foram raspadas em PBS contendo 0,2% de Triton X-100. A fluorescência foi medida com um leitor de placa (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) com excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos como percentual em relação às condições controle.

## 2.7 NÍVEIS DE TNF $\alpha$ E IL-1 $\beta$

Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no meio extracelular foram avaliados utilizando-se a técnica de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática; do inglês, “*enzyme-linked immunosorbent assay*”), com kits comerciais da PeproTech (Rocky Hill, NJ, Estados Unidos) e eBioscience (Estados Unidos), respectivamente. Os resultados foram expressos como percentual relativo aos níveis controle.

## 2.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

Medimos a quantidade de proteína nas amostras de acordo com o método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951).

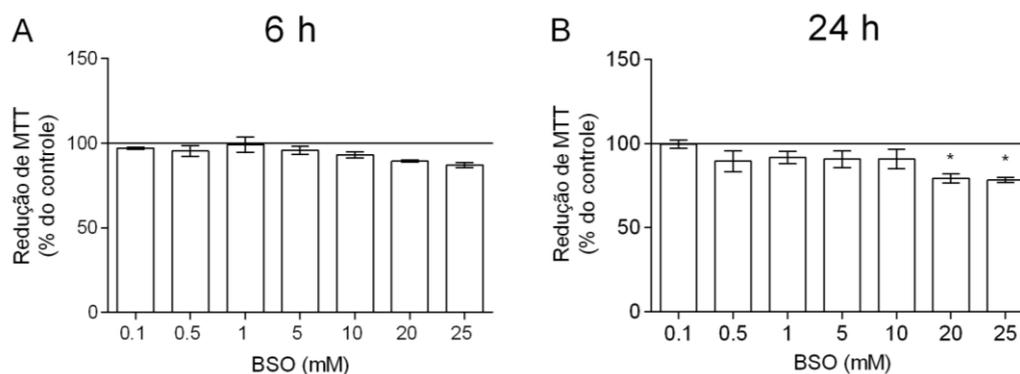
## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística da diferença entre os grupos foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. As análises foram conduzidas mediante a utilização do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados foram representados como média  $\pm$  E.P., sendo que *a* indica diferença significativa em relação às condições controle e *b* indica diferença significativa em relação ao tratamento com BSO.

### 3 RESULTADOS

Primeiramente, nós avaliamos os efeitos do BSO sobre a viabilidade das células astrogliais C6 a fim de determinar a concentração de BSO para os experimentos posteriores. Para isso, realizamos uma curva de concentração de BSO, que variou de 0,1 a 25 mM durante 6 e/ou 24 h. Os ensaios de incorporação de IP e de atividade do LDH foram realizados e indicaram não haver perda significativa da integridade da membrana celular. A viabilidade celular das células C6 (medida pela técnica de redução do MTT) não foi significativamente alterada após 6 h de exposição ao BSO (Fig. 1A), porém foi observada toxicidade nas células C6 tratadas com altas concentrações de BSO ( $\geq 20$  mM) por 24 h (Fig. 1B). Buscando uma concentração capaz de reduzir os níveis de GSH nas células astrogliais C6, porém sem causar perda da viabilidade destas células, nós estabelecemos o tratamento padrão com 5 mM de BSO por 24 h para investigar seus efeitos sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Para os tratamentos com resveratrol, nós usamos a concentração previamente testada e estabelecida pelo nosso grupo – 100  $\mu$ M (DOS SANTOS *et al.*, 2006; QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2009).

Figura 1 - Efeitos do BSO sobre a viabilidade celular de células astrogliais C6 após tratamentos por 6 h (A) e 24 h (B)

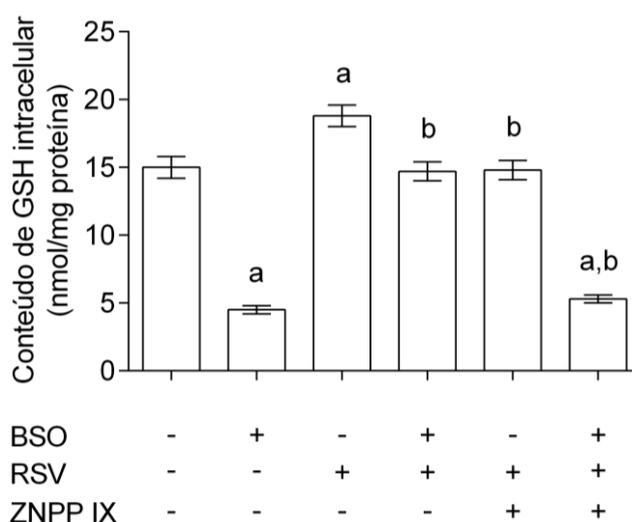


Fonte: Autor (2016). Os dados representam média  $\pm$  E. P. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. \* indica diferença significativa ( $P < 0,01$ ) em relação aos valores do controle.

Na sequência, os efeitos da depleção de GSH mediada por BSO nas células astrogliais C6 foram investigados. Como esperado, o tratamento com BSO 5 mM reduziu os níveis de GSH de  $15,0 \pm 0,8$  para  $4,5 \pm 0,3$  nmol/mg proteína ( $P < 0,01$ ; Fig. 2). Porém, quando as células foram pré-incubadas com resveratrol, o conteúdo

de GSH apresentou-se próximo aos níveis basais ( $14,7 \pm 0,7$ ). Além disso, o resveratrol *per se* foi capaz de aumentar os níveis intracelulares de GSH em aproximadamente 25% ( $P < 0,01$ ). Para testar o envolvimento da HO-1 neste efeito protetor do resveratrol, nós usamos o ZnPP IX, um inibidor específico desta via de sinalização. A pré-incubação com ZnPP IX aboliu completamente os efeitos do resveratrol.

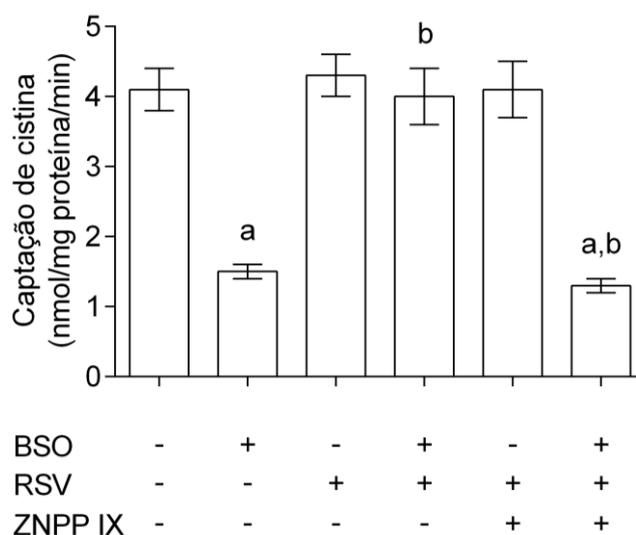
Figura 2 - Efeitos do resveratrol sobre a depleção de GSH mediada por BSO



Fonte: Autor (2016). Os dados representam média  $\pm$  E. P. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. a representa diferença significativa em relação aos valores do controle; b indica diferença significativa em relação ao tratamento com BSO.

Visto que o trocador  $x_c^-$  tem sido relacionado com a biossíntese de GSH, nós avaliamos a captação de cistina após os tratamentos com BSO/resveratrol. A incubação com BSO diminuiu a captação de cistina de  $4,1 \pm 0,3$  para  $1,5 \pm 0,1$  nmol/mg proteína/min ( $P < 0,01$ ; Fig. 3), ao passo que o pré-tratamento com resveratrol preveniu este efeito ( $P < 0,01$ ); entretanto, resveratrol *per se* não afetou a captação de cistina. Visto que a captação de cistina também é diretamente regulada pela HO-1, nós também testamos o efeito do ZnPP IX sobre a proteção do resveratrol. Quando co-incubado com ZnPP IX, o resveratrol não foi capaz de prevenir a queda na captação de cistina após o tratamento com BSO.

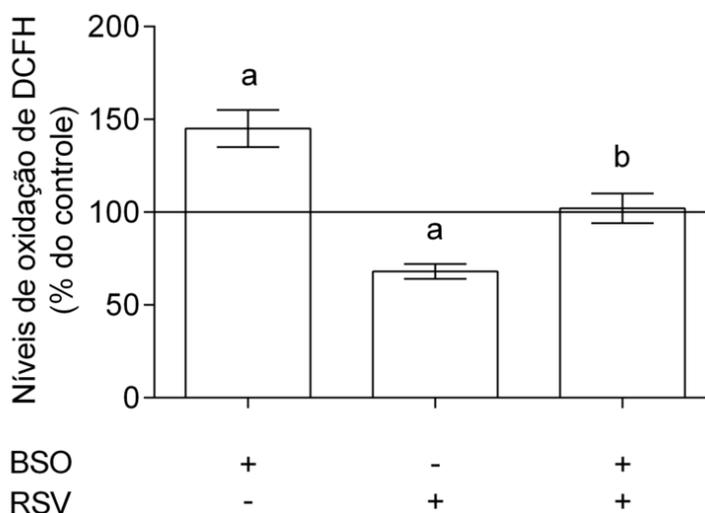
Figura 3 – Efeitos do resveratrol sobre a captação de cistina, na presença ou ausência do BSO e/ou do inibidor da HO-1, ZNPP IX



Fonte: Autor (2016). Os dados representam média  $\pm$  E. P. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. a representa diferença significativa em relação aos valores do controle; b indica diferença significativa em relação ao tratamento com BSO.

A produção intracelular de EROs foi avaliada a partir da oxidação do DCFH. Observou-se aumento de aproximadamente 45% ( $P < 0,01$ ) nos níveis de EROs nas células C6 expostas ao BSO 5 mM (Fig. 4). O pré-tratamento com resveratrol preveniu totalmente este efeito ( $P < 0,01$ ). Além disso, o resveratrol *per se* reduziu a produção de EROs em cerca de 32% ( $P < 0,05$ ).

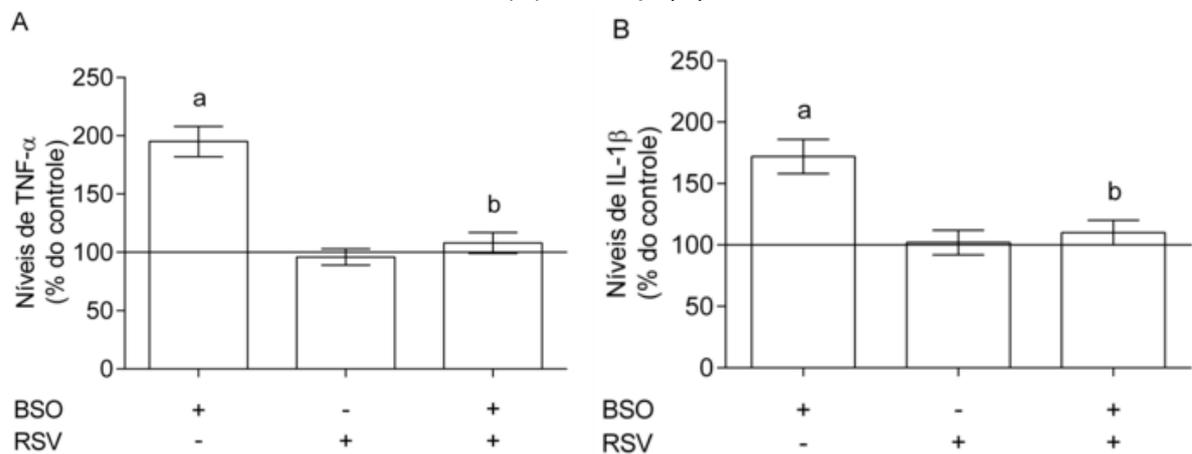
Figura 4 - Efeitos do resveratrol sobre a produção de EROs induzida pelo BSO



Fonte: Autor (2016). Os dados representam média  $\pm$  E. P. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. a representa diferença significativa em relação aos valores do controle; b indica diferença significativa em relação ao tratamento com BSO.

Tendo em vista que a produção de EROs possui um papel importante na resposta inflamatória, nós medimos a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no meio extracelular das células astrogliais C6 após a exposição ao BSO. O tratamento com BSO elevou tanto os níveis de TNF- $\alpha$  (aproximadamente 95%) quanto os de IL-1 $\beta$  (72%), comparados com as condições controle [P < 0.01, (Fig. 5A e B, respectivamente)]. Não obstante, o pré-tratamento com resveratrol significativamente preveniu a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzida pelo BSO, ao passo que o resveratrol *per se* não alterou os níveis destas citocinas.

Figura 5 - Efeitos do resveratrol na liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B)



Fonte: Autor (2016). Os dados representam média  $\pm$  E. P. de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. a representa diferença significativa em relação aos valores do controle; b indica diferença significativa em relação ao tratamento com BSO.

## 4 DISCUSSÃO

A depleção de GSH altera a funcionalidade glial, promovendo o desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante (LEE *et al.*, 2010). Logo, a redução nos níveis deste antioxidante resulta em estresse oxidativo, aumentando os níveis intracelulares de EROs, as quais podem estar associadas a resposta inflamatória (HALLIWELL, 2006; LEE *et al.*, 2010). Neste contexto, nossos resultados mostram que o tratamento com BSO diminuiu os níveis de GSH, aumentou a produção de EROs, bem como elevou a secreção dos mediadores pró-inflamatórios TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . No entanto, o pré-tratamento com resveratrol preveniu esses efeitos possivelmente por meio da modulação da biossíntese de GSH, com participação da via de sinalização da HO-1. Portanto, pela primeira vez é apresentado que o resveratrol é capaz de proteger células astrogliais C6 da toxicidade estimulada pelo BSO.

Os astrócitos são amplamente conhecidos pelo seu papel neuroprotetor no SNC. Sob condições normais, este tipo celular é responsável pela síntese e liberação de GSH e de outros metabólitos essenciais, como fatores de crescimento; entretanto, sob estresse oxidativo e neuroinflamação, podem produzir citocinas pró-inflamatórias e EROs, os quais aceleram a degeneração neuronal (KHAKH; SOFRONIEW, 2015). Uma das propriedades que evidenciam a relevância das células astrogliais na proteção do SNC é o trocador  $x_c^-$ , o qual é específico destas células, e diretamente coordenado pelo Nrf2/HO-1 (WEGRZYNOWICZ *et al.*, 2007; ESCARTIN *et al.*, 2011). O transportador  $x_c^-$  é essencial à biossíntese de GSH, devido à sua capacidade de captação de cistina do meio extracelular, em troca de glutamato, sendo de vital importância na manutenção do estado redox do SNC (WEGRZYNOWICZ *et al.*, 2007; SEIB *et al.*, 2011).

No processo biossintético da GSH, a cistina incorporada pelo trocador  $x_c^-$  é reduzida a cisteína, a qual é considerada o componente limitante da atividade da GCL e da síntese de GSH astrogliar (HERTZ; ZIELKE, 2004; LU, 2009). A captação de cistina pode ser modulada por diversas condições oxidantes e inflamatórias, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lipopolissacarídeo (SEIB *et al.*, 2011). Neste contexto de insulto, o aumento na captação de cistina leva à maior biodisponibilidade de cisteína, de modo que o sistema antioxidante endógeno é estimulado (LU, 2009; FERGUSON; BRIDGE, 2016). Além

disso, o aumento na captação de cistina pelas células astrogliais pode ser indicativo da atividade do transportador  $x_c^-$ .

A cisteína reduzida reage com o glutamato, para formar  $\gamma$ -GluCys sob atuação da GCL. O agente farmacológico BSO inibe seletivamente a GCL, de modo que promove a depleção dos níveis de GSH nas células astrogliais, estado que causa neurotoxicidade e está associado a diversos distúrbios neurodegenerativos, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (LEE *et al.*, 2010). Visando ao estudo dos mecanismos protetores do resveratrol sobre esta condição, tratamos as células astrogliais C6 com BSO, o que reduziu o conteúdo intracelular de GSH e a captação de cistina para cerca de 30% e 36% dos níveis basais, respectivamente.

O resveratrol pode exercer a sua atividade antioxidante agindo como um *scavenger* direto de radicais livres e/ou regulando positivamente as defesas antioxidantes endógenas e vias de sinalização celular (QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011; RICHARD *et al.*, 2011; BASTIANETTO *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2016). Embora os mecanismos exatos pelos quais o resveratrol exerce seus efeitos ainda não estejam bem estabelecidos, a via de sinalização da HO-1 tem sido identificada como um importante mecanismo para explicar o papel desta molécula na resposta ao estresse (SAKATA *et al.*, 2010). A indução da expressão da HO-1 é associada a efeitos protetores contra situações de estresse: a HO-1 estimula vias celulares endógenas que levam à resistência contra condições associadas ao estresse oxidativo, como o sistema da GSH, deste modo conferindo neuroproteção (BASTIANETTO; QUIRION, 2010; SAKATA *et al.*, 2010; WAKABAYASHI *et al.*, 2010). Neste sentido, moléculas que atuam por meio desta via apresentam potencial farmacológico.

Nosso grupo recentemente demonstrou que o resveratrol protege células astrogliais C6 da toxicidade por  $H_2O_2$ , bem como as células astrocíticas primárias do insulto com lipopolissacarídeo, pela via de sinalização da HO-1 (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2013; BELLAVAR *et al.*, 2015). Como mencionado acima, a HO-1 é um gene alvo do Nrf2, o qual, quando acionado sob situações de estresse, pode ativar a região promotora da HO-1 que possui o elemento de resposta antioxidante (ARE, em inglês), ativando a via de sinalização da HO-1 (WAKABAYASHI *et al.*, 2010).

Os resultados deste trabalho mostram que o pré-tratamento com resveratrol preveniu a depleção de GSH induzida pelo BSO, bem como a redução na captação

de cistina. Esse efeito foi abolido quando o inibidor da HO-1, ZnPP IX, foi co-incubado, evidenciando a participação desta via de sinalização no efeito protetor do resveratrol. Diante do insulto com BSO, o resveratrol pode ter exercido seus efeitos mediante a ativação do fator de transcrição Nrf2, o que é capaz de explicar a participação da HO-1 no aumento da biossíntese de GSH. Além disso, como o aumento dos níveis de GSH foi acompanhado pela elevação da atividade de transporte de cistina, pode ter havido a ativação da GCL e do transportador xc<sup>-</sup>, ambos também alvos do Nrf2 (WEGRZYNOWICZ *et al.*, 2007; WAKABAYASHI *et al.*, 2010). Não obstante, para se testar essa hipótese, futuros experimentos devem ser feitos tendo o objetivo de investigar a participação específica deste fator de transcrição. Apesar da incerteza quanto à complexidade dos mecanismos envolvidos, nossos dados demonstram que os efeitos protetores do resveratrol contra a citotoxicidade do BSO estão intimamente relacionados à capacidade de modulação da biossíntese de GSH, com a participação da HO-1. Assim, nossos resultados reforçam o papel antioxidante do resveratrol.

Em relação ao sistema oxidante, nosso estudo demonstrou que o tratamento com BSO aumentou significativamente a produção de EROs nas células astrogliais C6. Por ser associada ao estresse oxidativo, a depleção de GSH nas células gliais induz resposta inflamatória, com o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células astrogliais (LEE *et al.*, 2010). TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são citocinas pró-inflamatórias clássicas que possuem um papel predominante na neuroinflamação devido à sua capacidade de induzir a ativação de outras citocinas (TANABE *et al.*, 2010; TANABE *et al.*, 2011). A secreção dessas citocinas por células gliais é fortemente correlacionada com várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (OLMOS; LLADO, 2014). O presente estudo demonstrou que o aumento dos níveis de EROs após o tratamento com BSO foi acompanhado pelo aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , corroborando com a associação entre a produção de EROs e a neuroinflamação. O resveratrol, por sua vez, foi capaz de atenuar os efeitos tanto oxidativos quanto inflamatórios, provavelmente por meio da modulação do conteúdo intracelular de GSH. Vários estudos anteriores que avaliaram os efeitos do resveratrol sobre diversos insultos neurotóxicos, incluindo alguns do nosso grupo, encontraram efeitos similares desta molécula sobre a inibição da produção de EROs e da secreção de citocinas pró-inflamatórias (MANNA *et al.*, 2000; BOBERMIN *et al.*, 2012; QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013;

BELLAVER *et al.*, 2014; KULKARNI; CANTO, 2015). Nossos dados, portanto, contribuem para reforçar o papel antioxidante e anti-inflamatório do resveratrol.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando que o BSO possui função crítica na depleção da GSH, nossas observações sugerem que o resveratrol atenua a citotoxicidade do BSO ativando a biossíntese intracelular de GSH, em parte pela indução da via da HO-1. Além disso, o resveratrol preveniu a produção de EROs após a depleção de GSH em células C6, bem como reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Neste sentido, nossos dados reforçam as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do resveratrol, além do seu uso potencial como agente protetor contra resposta oxidativa e inflamatória estimulada pela depleção de GSH, condição a qual pode estar associada a diversos distúrbios degenerativos neurológicos.

Neste trabalho foi lançada a hipótese de que o resveratrol pode estar ativando não somente a via da HO-1, mas também o fator de transcrição Nrf2, modulador da HO-1. Portanto, estudos futuros devem investigar o papel do Nrf2 como mecanismo de indução da HO-1 pelo resveratrol. Assim, devem-se avaliar a atividade e expressão da GCL e do trocador  $x_c^-$ , ambos também alvos do Nrf2, para se compreender o papel do resveratrol sobre essas moléculas na condição de depleção de GSH.

## REFERÊNCIAS

- ALBANI, D. et al. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. **Biofactors**, v. 36, n. 5, p. 370-6, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848560> >. Acesso em: 15/06/2016.
- AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8742-58, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26007177> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BASTIANETTO, S.; MENARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1195-201, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25281824> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Heme oxygenase 1: another possible target to explain the neuroprotective action of resveratrol, a multifaceted nutrient-based molecule. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 2, p. 237-9, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603117> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732220> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281-95, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877496> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BELLAVER, B. et al. Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways. **Neurochemical Research**, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26088684> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BELLAVER, B. et al. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 4, p. 479-84, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462605> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BENEDIKTSSON, A. M. et al. Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. **Glia**, v. 60, n. 2, p. 175-88, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052455> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BOBERMIN, L. D. et al. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52164, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284918> >. Acesso em: 15/06/2016.
- BRAMANTI, V. et al. Cholinergic precursors modulate the expression of heme oxygenase-1, p21 during astroglial cell proliferation and differentiation in culture.

**Neurochemical Research**, v. 37, n. 12, p. 2795-804, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956150> >. Acesso em: 15/06/2016.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, p. 347-52, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921543> >. Acesso em: 15/06/2016.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161-7, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904623> >. Acesso em: 15/06/2016.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649-71, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880854> >. Acesso em: 15/06/2016.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 4, p. 505-16, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751781> >. Acesso em: 15/06/2016.

ESCARTIN, C. et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 20, p. 7392-401, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593323> >. Acesso em: 15/06/2016.

FERGUSON, G.; BRIDGE, W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of gamma-glutamylcysteine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 593, p. 12-23, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26845022> >. Acesso em: 15/06/2016.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805774> >. Acesso em: 15/06/2016.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463-77, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962261> >. Acesso em: 15/06/2016.

HERTZ, L.; ZIELKE, H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 12, p. 735-43, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541514> >. Acesso em: 15/06/2016.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 942-52, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108722> >. Acesso em: 15/06/2016.

KULKARNI, S. S.; CANTO, C. The molecular targets of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1114-23, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315298> >. Acesso em: 15/06/2016.

LEE, M. et al. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 7, p. 2533-45, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228251> >. Acesso em: 15/06/2016.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >. Acesso em: 15/06/2016.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42-59, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601945> >. Acesso em: 15/06/2016.

MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6509-19, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843709> >. Acesso em: 15/06/2016.

MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 12, p. 679-89, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17117171> >. Acesso em: 15/06/2016.

OLMOS, G.; LLADO, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 861231, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24966471> >. Acesso em: 15/06/2016.

PEREA, G.; SUR, M.; ARAQUE, A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 378, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414643> >. Acesso em: 15/06/2016.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64372, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691207> >. Acesso em: 15/06/2016.

QUINCOZES-SANTOS, A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 72-8, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261643> >. Acesso em: 15/06/2016.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. The janus face of resveratrol in astroglial cells. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 1, p. 30-41, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526296> >. Acesso em: 15/06/2016.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Histology of the nervous system of man and vertebrates**. New York: Oxford University Press, 1995.

REGE, S. D. et al. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309423> >. Acesso em: 15/06/2016.

RICHARD, T. et al. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 103-8, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261647> >. Acesso em: 15/06/2016.

SAKATA, Y. et al. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 325-9, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381489> >. Acesso em: 15/06/2016.

SANTELLLO, M.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. TNFalpha controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. **Neuron**, v. 69, n. 5, p. 988-1001, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382557> >. Acesso em: 15/06/2016.

SEIB, T. M.; PATEL, S. A.; BRIDGES, R. J. Regulation of the system x(C)-cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. **Glia**, v. 59, n. 10, p. 1387-401, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590811> >. Acesso em: 15/06/2016.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555943> >. Acesso em: 15/06/2016.

TANABE, K.; KOZAWA, O.; IIDA, H. Midazolam suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-6 release from rat glial cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 68, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682888> >. Acesso em: 15/06/2016.

TANABE, K. et al. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 16, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205746> >. Acesso em: 15/06/2016.

VANG, O. et al. What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e19881, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019881> >. Acesso em: 15/06/2016.

VARONI, E. M. et al. Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, p. 8, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148534> >. Acesso em: 15/06/2016.

WAKABAYASHI, N. et al. When NRF2 Talks, Who's Listening? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 11, p. 1649-63, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367496> >. Acesso em: 15/06/2016.

WEGRZYNOWICZ, M. et al. Upregulation of cerebral cortical glutathione synthesis by ammonia in vivo and in cultured glial cells: the role of cystine uptake. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 883-9, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239489> >. Acesso em: 15/06/2016.

XIA, N. et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27058985> >. Acesso em: 15/06/2016.