



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Crisina Previne a Neurotoxicidade Induzida por Cloreto de Alumínio em
Camundongos Swiss Machos**

HERICLES MESQUITA CAMPOS

GOIÂNIA-GO

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Hericles Mesquita Campos

3. Título do trabalho

Crisina Previne a Neurotoxicidade Induzida por Cloreto de Alumínio em Camundongos Swiss Machos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo César Ghedini, Professor do Magistério Superior**, em 25/08/2022, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **HERICLES MESQUITA CAMPOS, Discente**, em 25/08/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3141271** e o código CRC **5EA8D890**.

HERICLES MESQUITA CAMPOS

**Crisina Previne a Neurotoxicidade Induzida por Cloreto de Alumínio
em Camundongos Swiss Machos**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini

GOIÂNIA-GO

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Campos, Hericles Mesquita

Crisina Previne a Neurotoxicidade Induzida por Cloreto de Alumínio em Camundongos Swiss Machos [manuscrito] / Hericles Mesquita Campos. - 2022.

XCV, 95 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ghedini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, listade tabelas.

1. Alumínio. 2. neurotoxicidade. 3. estresse oxidativo. 4. antioxidante. 5. crisina. I. Ghedini, Paulo César, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 536 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Hericles Mesquita Campos** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro de 2022, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Crisina Previne a Neurotoxicidade Induzida por Cloreto de Alumínio em Camundongos Swiss Machos”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Paulo César Ghedini (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Carolina Demarchi Munhoz (USP), membro titular externo; Professora Doutora Djane Braz Duarte (UNB), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Paulo César Ghedini, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e oito dias do mês de janeiro de 2022.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Paulo César Ghedini, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Demarchi Munhoz, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Djane Braz Duarte, Usuário Externo**, em 28/01/2022, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2653449** e o código CRC **C9C01873**.

Referência: Processo nº 23070.001644/2022-19

SEI nº 2653449

“Aí, maloqueiro, aí, maloqueira;
Levanta essa cabeça;
Enxuga essas lágrimas, certo? (Você memo);
Respira fundo e volta pro ringue (vai);
Cê vai sair dessa prisão;
Cê vai atrás desse diploma;
Com a fúria da beleza do sol, entendeu?;
Faz isso por nós;
Faz essa por nós (vai);
Te vejo no pódio”;

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meus queridos avós Lazará das Dores de Mesquita, Sinvaldo Antônio Ribeiro, e Stelita Campos da Silva e as minhas bisavós Felisbina Jacinta de Mesquita e Laurentina Pereira Campos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais Divina Paula de Mesquita Campos e Sidney Campos da Silva e ao meu irmão Guilherme Mesquita Campos, por toda base, apoio e auxílio. Os três, mais do que ninguém, sabem quais foram os sacrifícios e desafios que passamos, para eu estar aqui hoje. Ao meu irmão, que através dele crio forças, para que um dia eu possa providenciar as oportunidades e base que eu, meus pais, meus avôs e nossos ancestrais não tiveram (ou aquelas que foram tiradas de nós).

Agradeço também às minhas avós Lázara das Dores de Mesquita e Stelita Campos da Silva e ao meu avô Sinvaldo Antônio Ribeiro (*in memorian*), que são, com certeza, os melhores avôs do mundo: sempre estiveram presentes, sempre apoiaram e incentivaram essa caminhada. Agradeço imensamente, sem eles nenhum feito aqui seria realizado.

Agradeço também a todos os integrantes da minha família que, apesar de sermos uma família grande, conseguimos nos manter bastantes unidos. Aos meus tios Daniel, Gabriel, Sandro, Sidvan e, em especial, à Sirley Campos da Silva. Eles deram muito apoio para minha família, muitos desafios e obstáculos só foram possíveis atravessar com a ajuda deles. Sem eles provavelmente não teria nem finalizado a graduação.

Agradeço à todos meus amigos dentro e fora da pós-graduação: Ana Maria e Gustavo Fernandes, Larissa Ribeiro, Amanda Costa, Raquel Alves, Vanessa Justino, Gisele Amaral, Nicole Mércia e Daniella Lisboa. Em especial ao Lucas Araújo Ferreira e Renato César Rodrigues, amigos muito importantes para mim, sempre estiveram nos momentos bons e nos difíceis, aconselhando, conversando, me fazendo rir e refletir, sempre me dando forças todos os dias para continuar.

Um grande agradecimento a minha amiga Stéphanie Silva Cardoso, irmã de outra mãe, colega e amiga, no qual tive o prazer de conhecer e poder trabalhar. Ao meu lado enfrentamos o dia-a-dia da pós-graduação, todas as dificuldades, desafios, trabalhos, experimentos e tensões. Sempre apoiando e aconselhando, literalmente segurando a barra e estando presente nos momentos mais difíceis e felizes dessa jornada. Muito obrigado por sua amizade.

Gostaria de agradecer aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, aos integrantes que já finalizaram seu ciclo: Thiago Sardinha, Christielly Rodrigues, Hiasmin Neri e Letícia Nascimento. Com eles, com certeza aprendi muito sobre pesquisa e, pessoalmente, estiveram ali sempre ensinando desde cálculos matemáticos até experimentos mais complexos. Tenho muito a agradecer. E aos integrantes atuais: Evelyn Araújo, Gustavo Mota Galvão, Victor Okoh e Robbert Mota, pessoas especiais que me auxiliaram em todos os passos desse processo, me ajudaram em experimentos, no dia-a-dia do laboratório, nas organizações, limpezas, desde os momentos fáceis até os difíceis, sem eles com certeza, não haveria andamento do laboratório. Em especial, à Cínthia Rio Branco e Jacqueline Alves Leite, exemplos de luta e sobrevivência, seres humanos incríveis que chegaram com bastante humildade, conselhos e parceria. Vocês, com certeza, são espelhos para meus objetivos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, professor e doutor Paulo César Ghedini, conto com sua orientação há mais de 6 anos, desde o segundo semestre da minha graduação. Agradeço imensamente a oportunidade que me deu, lembro-me que, em nossa primeira reunião, você perguntou a mim e aos meus colegas “se sabíamos como um laboratório funcionava”, “se sabíamos o que eram as vidrarias” e “se tínhamos farmacologia na grade”. Para todas essas perguntas, nossas respostas foram “não” e, apesar da nossa falta de conhecimento em tudo, você nos deu a oportunidade de ser IC e isso, com certeza, mudou muito minha vida: cresci tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Gostaria de agradecer imensamente à toda equipe de limpeza, de todos os Institutos de Ciências Biológicas, em especial Dina e Maria. Vocês estão todos os dias ali, mantendo o ambiente limpo e organizado, sempre receptivas e alegres, agradeço imensamente ao trabalho que vocês fazem.

Parte da realização do meu mestrado ocorreu durante a pandemia do Covid-19, por isso, gostaria de homenagear à todas as pessoas que infelizmente foram vítimas dessa doença e agradecer imensamente todos os profissionais da saúde que através de pesquisas ou na linha de frente, lutaram para salvar e proteger vidas.

Por fim gostaria de agradecer a agência de fomento, onde o presente trabalho foi realizado com apoio e pela concessão de bolsa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE	xix
1. Introdução	18
1.1. Alumínio e seus aspectos	19
1.2. Alumínio e as DNS.....	20
1.3. Radicais livres e estresse oxidativo.....	22
1.4. Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.....	23
1.5. Nutracêuticos	25
1.6. Crisina	27
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Drogas e reagentes.....	32
3.2. Experimentos <i>in vivo</i>	32
3.2.1. Animais.....	32
3.2.2. Protocolo experimental	32
3.3. Testes comportamentais	33
3.3.1. Teste de campo aberto (CA)	33
3.3.2. Teste de chaminé (CM)	34
3.3.3. Teste de esquiva passiva (EP)	34
3.4. Experimentos <i>ex vivo</i>	35
3.4.1. Coleta e preparação do tecido.....	35
3.5. Testes bioquímicos	35
3.5.1. Atividades das colinesterases (ChEs)	35
3.5.2. Níveis de peroxidação lipídica (LPO).....	36
3.5.3. Níveis de proteínas carboniladas (PC)	36
3.5.4. Atividades da enzima superóxido dismutase (SOD).....	37
3.5.5. Atividade da enzima catalase (CAT).....	37

3.5.6.	Determinação da quantidade de proteínas	37
3.6.	Análises histopatológicas e morfométricas	38
3.7.	Análise estatística e apresentação dos dados	39
4.	Resultados	40
4.1.	Resultados dos testes <i>in vivo</i>	41
4.1.1.	Testes comportamentais	41
4.1.2.	Testes de Campo aberto (CA) e Chaminé (CM)	41
4.1.3.	Teste de Esquiva Passiva (EP)	41
4.2.	Resultados <i>ex vivo</i>	42
4.2.1.	Testes bioquímicos	42
4.2.2.	Atividades das colinesterases (ChEs)	42
4.2.3.	Níveis de Lipoperoxidação lipídica (LPO)	44
4.2.4.	Níveis de proteínas carboniladas (PC)	45
4.2.5.	Atividades da enzima superóxido dismutase (SOD)	46
4.2.6.	Atividades da enzima catalase (CAT)	47
4.3.	Análises histopatológicas e morfométricas	48
5.	Discussão	51
6.	Conclusão	57
7.	Referências bibliográficas	59
8.	Anexo	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micromol
Abs.	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AEN	Associação Europeia de Nutracêuticos
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
Al	Alumínio
AlCl₃	Cloreto de Alumínio
ANOVA	Análise de Variância
ATCh	Acetilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês " <i>bovine serum albumin</i> ")
BTCh	Butirilcolina
CA	Campo aberto
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
ChAT	Colina acetiltransferase
ChEs	Colinesterases
cm	Centímetros
CM	Chaminé
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DN	Doenças Neurodegenerativas
DP	Doença de Parkinson
DTNB	5:5-ditiobis-2-nitrbenzoato
EP	Esquiva passiva
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
h	Horas
H₂O	Água
H₂O₂	Peroxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina & Eosina
HT	Homogeneizado total
kg	Quilogramas
L	Litro
LPO	Peroxidação lipídica (do inglês " <i>Lipid peroxidation</i> ")
M	Molaridade

MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
nmol	Nanomol
O₂^{°-}	Radical Superóxido
OH[°]	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	Peso / volume
PC	Proteínas carboniladas
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
S1	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês " <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> ")
UV	Ultravioleta
v.o.	Via de administração oral (gavagem)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplificação dos materiais e objetos que são fabricados à base de alumínio: panelas, colheres, embalagens para alimentos líquidos e sólidos e embalagens para medicamentos.19
- Figura 2:** Diferentes vias de atuação do Al, promovendo disfunções no sistema colinérgico, aumentando a expressão de proteínas importantes para o acometimento e progressão de DNs e alteração do estado redox, aumentando a produção de RLs e EROs que levam à LPO e ao estresse oxidativo.....21
- Figura 3:** Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons. Exemplificação das reações que formam radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Barbosa et al., 2010.23
- Figura 4:** Exemplificação do sistema enzimático antioxidante. Na imagem mostramos os mecanismos das enzimas SOD, CAT e GPx. Exemplifica-se a importância na redução dos RLs e ROS. Adaptado de González et al., 2003.....24
- Figura 5:** Exemplificação da interface entre o alimento convencional e funcional com o suplemento alimentar e medicamentos e sua relação com os nutracêuticos. Adaptado de Diaz et al., 2019.26
- Figura 6:** Estrutura química da crisina (5,7-dihidroxi-flavona). Fórmula química: $C_{15}H_{10}O_4$. Peso molecular: 254,24 g/mol. Retirado de Mani e Natesan, 2018.27
- Figura 7:** Exemplificação do delineamento experimental para os tratamentos dos animais. À esquerda está representado o tratamento 1, onde todos os grupos recebem do 1° ao 90° dia, $AlCl_3$ (100 mg/kg) com exceção do grupo controle que recebe água destilada, e o tratamento 2, onde a partir do 46° os grupos controle e $AlCl_3$ recebem solução salina normal e o restante dos grupos receberam as respectivas doses de crisina 10, 30 e 100 mg/kg. À direita estão organizados os testes comportamentais e coleta de material para testes bioquímicos.33
- Figura 8:** Exemplificação do protocolo experimental para os experimentos comportamentais. O teste de chaminé realizado no 90° dia, o teste de campo aberto no 91° dia e o teste de esqui passiva no 91° e 92°. Juntamente com a sequência das análises bioquímicas, histopatológicas e morfométricas, realizadas ex vivo.....38
- Figura 9:** Efeitos dos tratamentos sobre o prejuízo de memória induzido pelo $AlCl_3$, no teste de esqui passiva. Dados são apresentados como a média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 14 a 16 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ^a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo

controle; ^b p = 0.0310 quando comparado ao grupo AlCl₃. ^c p = 0.0370 quando comparado ao grupo AlCl₃. ^d p = 0.0320 quando comparado ao grupo AlCl₃.42

Figura 10: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e no hipocampo sobre a atividade da AChE em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados estão representados como a média ± E.P.M. para o n amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ^e p = 0,0013 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,0118, ^g p = 0,0187 e ^h p = 0,0215 quando comparado ao grupo AlCl₃ para a atividade da AChE no hipocampo.43

Figura 11: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e no hipocampo sobre a atividade da BChE em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados estão representados como a média ± E.P.M. para o n amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey; ^e p <0,0002, quando comparado ao grupo controle. ^f p = 0,0111, ^g p = 0,0115 e ^h p = 0,0194 quando comparado ao grupo AlCl₃ para a atividade da BChE no hipocampo.44

Figura 12: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre os níveis de LPO em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a p ≤ 0,0001 quando comparado ao grupo controle, ^b p ≤ 0,001, ^c p = 0,032 e ^d p = 0,010 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de MDA no córtex cerebral; ^e p = 0,0005 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,0002, ^g p = 0,0001 e ^h p = 0,0001 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de MDA no hipocampo.45

Figura 13: Efeito dos tratamento no córtex cerebral e hipocampo sobre os níveis de PC em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a p = 0,0001 quando comparado ao grupo controle para os níveis de CP no córtex cerebral; ^e p = 0,0153 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,001, ^g p = 0,027 e ^h p = 0,021 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de PC do hipocampo.46

Figura 14: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre a atividade da SOD em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para o N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a p = 0,0001, quando comparado ao grupo controle; ^b p = 0,0014, ^c p = 0,0385 e ^d p = 0,0395, quando comparado ao grupo AlCl₃, para as atividades da SOD no córtex cerebral; ^e p = 0,0015 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,0084, ^g p = 0,0001 e ^h p = 0,0001 quando comparado ao grupo AlCl₃, para as atividades da SOD no hipocampo.47

Figura 15: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre a atividade da CAT em camundongos tratados com AlCl_3 . Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^e $p = 0,0012$ quando comparado ao grupo controle; ^f $p = 0,0064$, ^g $p = 0,0001$ e ^h $p = 0,0002$ quando comparado ao grupo AlCl_3 , para as atividades da CAT no hipocampo.48

Figura 16: Frequência de neurônios necróticos no córtex cerebral e hipocampo. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a $p = 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; ^b $p = 0,0001$, ^c $p = 0,0001$ e ^d $p = 0,0001$ quando comparado ao grupo AlCl_3 , para frequência de células necróticas no córtex cerebral. ^e $p = 0,0041$ quando comparado ao grupo controle; ^f $p = 0,0334$, ^g $p = 0,0387$ e ^h $p = 0,0003$ quando comparado ao grupo AlCl_3 , para frequência de células necróticas no hipocampo.49

Figura 17: Cortes histológicos do córtex cerebral na região CA1 e do hipocampo. Método de coloração com tionina acética. As setas indicam neurônios em degeneração com aparência de necrose. Esses neurônios se coram intensamente em roxo escuro e mostram degeneração nuclear e citoplasma atrófico. Todos os tratamentos com crisina promoveram uma redução nos neurônios degenerativos tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo.50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades exploratória e locomotora dos camundongos submetidos aos testes de CA e CM. Dados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. para o N amostral entre 14 -16 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) para ambos os testes.**41.**

RESUMO

O acúmulo crônico de alumínio (Al) no sistema nervoso central contribui para a progressão de doenças neurológicas e neurodegenerativas. Em particular, o Al promove dano oxidativo, morte neuronal e declínio funcional, resultando em déficits de cognição, alterações na memória e comportamento. Nesse sentido, o uso de antioxidantes naturais pode ser uma estratégia para atenuar a neurotoxicidade do Al. A crisina é um composto fenólico natural encontrado em alimentos como mel, maracujá e própolis com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Os efeitos protetores da crisina contra a neurotoxicidade induzida pela exposição crônica ao cloreto de alumínio (AlCl_3 - 100 mg/kg, v.o.) foram avaliados em camundongos tratados com AlCl_3 por noventa dias consecutivos e, a partir do quadragésimo sexto dia, os animais receberam crisina (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.). A crisina reduziu o comprometimento cognitivo induzido por AlCl_3 no teste de esquiva passiva e normalizou as atividades da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase no hipocampo. Sua ação antioxidante foi demonstrada pela diminuição do estresse oxidativo, evidenciados pelos níveis de peroxidação lipídica, pela carbonilação de proteínas e pela atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo. Além disso, a frequência das células necróticas nessas mesmas regiões cerebrais também foram normalizadas pelo tratamento com a crisina. Esses resultados demonstram que a crisina é capaz de diminuir os efeitos neurotóxicos associados à exposição crônica de Al, sendo um potencial composto presente em alimentos que podem ser utilizados para o benefício da saúde mental.

Palavras-Chave: Alumínio; neurotoxicidade; estresse oxidativo; antioxidante; crisina.

ABSTRACT

Chronic aluminium (Al) metal accumulation contributes to the progression of several neurological and neurodegenerative diseases. In particular, Al promotes oxidative damage, neuronal death, and functional decline resulting in deficits in cognition, memory and behavior. In this regard, the use of natural antioxidants can be a strategy to prevent the neurotoxicity of Al. Chrysin is a natural phenolic compound found in foods such as honey, passion fruit, and propolis and with antioxidant and anti-inflammatory properties. Here, we evaluated the chrysin neuroprotective effects against the neurotoxicity induced by chronic exposure to aluminium chloride (AlCl_3), in mice (100 mg/kg, p.o.). The experimental protocol consisted of the treatment of mice with AlCl_3 for ninety consecutive days, being the chrysin administration (10, 30, 100 mg/kg, p.o.) started on the forty-sixth day of the Al intake. Chrysin reduced the cognitive impairment induced by AlCl_3 in the step-down passive avoidance task, normalizing the hippocampus acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. Along with this, chrysin decreased oxidative damage observed in the parameters of the lipid peroxidation, protein carbonylation, catalase and superoxide dismutase activities in the brain cortex and hippocampus. Furthermore, necrotic cells frequency was also decreased by chrysin in the same brain regions. These results highlighted that chrysin is able to reduce the neurotoxic effects associated with Al chronic exposure, being a potential compound present in foods that can be used for the benefit of mental health.

Keywords: Aluminium; neurotoxicity; oxidative stress; antioxidant; Chrysin.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

O alumínio é um metal abundantemente encontrado na crosta terrestre, sendo utilizado em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas e, assim sendo, há a facilidade de exposição para os seres humanos. O acúmulo desse metal nos sistemas biológicos, promove efeitos indesejados, como a inibição de enzimas importantes do sistema antioxidante e o aumento dos níveis de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que culminam no aumento do estresse oxidativo. Consequentemente, ocorre a neurotoxicidade e o surgimento de doenças neurológicas e neurodegenerativas, com comprometimento cognitivo e alterações comportamentais.

Atualmente, as doenças neurológicas e neurodegenerativas não possuem cura, sendo que os tratamentos utilizados são para conter o avanço da doença e tratar os sintomas existentes. Diante dessa condição, é necessária a busca por novas terapias e tratamentos visando a cura e também melhorar a qualidade de vida dos pacientes com essas doenças. Entre as estratégias para alcançar esses objetivos, está o uso de produtos naturais e nutracêuticos (alimentos ou parte do alimento que promove efeitos farmacológicos). Tendo em vista que a crisina é um composto antioxidante presente em diversos produtos naturais (maracujá, cogumelos, própolis e mel), o objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos protetores da crisina contra a neurotoxicidade induzida pelo alumínio.

Os resultados mostraram que a crisina reduziu os efeitos neurotóxicos induzidos pelo alumínio restaurando a perda de memória e os marcadores de estresse oxidativo. Esses dados corroboram para o potencial uso da crisina como suplemento alimentar visando a seu efeito protetor contra a neurotoxicidade e o possível surgimento de doenças neurodegenerativas.

1. Introdução

1.1. Alumínio e seus aspectos

O alumínio (Al) é um metal amplamente distribuído no meio ambiente, por isso torna-se facilmente encontrado na superfície terrestre (aproximadamente 8,5%) nos estados de silicatos, óxidos e hidróxidos, podendo também interagir com outros elementos formando matéria orgânica [1,2]. O Al é amplamente utilizado nas indústrias de materiais (acessórios e objetos), alimentícios, farmacêuticos e de tinturas (Figura 1) [2,3,4].



Figura 1: Exemplificação dos materiais e objetos que são fabricados à base de alumínio: panelas, colheres, embalagens para alimentos líquidos e sólidos e embalagens para medicamentos.

Ao longo do tempo, houve o aumento da aplicação do Al na manufatura, agricultura e avanços tecnológicos, levando ao aumento à exposição deste metal para os animais e seres humanos [4]. Como todos os metais, o Al possui a capacidade de se acumular em tecidos biológicos e de promover distúrbios quando expostos à grandes quantidades [5]. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs), a ingestão semanal de Al, tolerável para humanos é de até 1 mg/kg de peso corporal, em um adulto de 60 kg. No entanto, para alguns indivíduos, essa ingestão é excedida, como resultado da exposição alimentar diária, onde a ingestão de Al pode ser estimada entre 1,6–13 mg (0,2–1,5 mg/kg de peso corporal / semana) [1,5,6].

Os efeitos tóxicos do Al ocorrem pelo seu acúmulo ao longo do tempo, várias fontes contribuem para a exposição do Al em humanos, como áreas industriais (0,04 – 1,4 mg/m³/dia), na água natural, onde em diferentes cidades ao redor do mundo

relataram concentrações altas (0,4 – 2,7 mg/L), em alimentos (3 – 11 mg/kg/dia), medicamentos como antiácido (104 – 208 mg de Al por comprimido) e aspirina (10 – 20 mg de Al por comprimido) e em cosméticos (10,98 - 694,5 mg/kg) [8,9].

O alumínio acumula-se em tecidos que constituem o sistema nervoso central (SNC) ao atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), essa rota foi definida como a principal via de captação do Al cerebral, uma vez que o Al atravessa a BHE por ser uma molécula de baixo peso molecular [10]. Além disso, a chegada do Al ao cérebro pode acontecer através da mediação pelo receptor transferrina, um importante transportador de ferro, pode ser mediado também pelos transportadores de ácido monocarboxílico e pelos transportadores de glutamato Independente de sódio [10].

É bem descrito que o acúmulo de Al leva a diversos efeitos em mecanismos celulares, dentre eles a alteração na transcrição e expressão gênica, inibição e indução enzimática e alterações nas produções energéticas e nas conformações de proteínas [2,5,11]. Essas mudanças podem promover atrofia, displasia, degeneração, necrose e apoptose celular [11,12,13].

A toxicidade causada pelo alumínio está associada a diversas doenças e condições, como: lesões pulmonares, cânceres, anormalidades ósseas, toxicidade nos sistemas renais, reprodutores, imunológicos e metabólicos, transtornos mentais e doenças neurodegenerativas (DNs) [14,15,16,17].

Com relatado anteriormente o Al atravessa a BHE, onde acumula-se facilmente neste tecido, promovendo alterações a nível de SNC [5,18]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as alterações promovidas pelo Al estão diretamente associadas à transtornos como espectro autista e esquizofrenia, além das DNs como esclerose múltipla, doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) [5,19,20,21,22,23].

1.2. Alumínio e as DNs

A neurotoxicidade promovida pelo Al no SNC tem sido correlacionada a vários mecanismos, tanto de doenças quanto de processos neuropatológicos como, por exemplo, o aumento do acúmulo e formação da α -sinucleína e das placas amiloides, a sinalização pró-inflamatória, a desregulação do sistema imune, degeneração neural e alterações na expressão gênica essenciais para o funcionamento do SNC

[10,20,24]. Essas alterações neuroquímicas e genéticas estão diretamente ligadas à alterações comportamentais, cognitivas e de memória [21,25].

Atualmente é bem descrito que proteínas como a α -sinucleína, β -amiloide e Tau são as principais vias da fisiopatologia da DP (α -sinucleína) e da DA (β -amiloide e proteína Tau). As mesmas têm suas expressões aumentadas e suas estruturas modificadas pelo Al, formando placas e emaranhados fibrilares mais facilmente. Assim, a neurotoxicidade por Al está associada tanto ao início, quanto a velocidade de progressão dessas doenças (Figura 2) [21, 26,27,28].

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema colinérgico importante para a formação e manutenção da memória atuando, principalmente, nas regiões do córtex cerebral e hipocampo. O Al promove alterações significantes neste sistema: I) Diminui a liberação de ACh [31]; II) promove o aumento da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), enzimas responsáveis pela degradação de ACh [32]; III) Diminui a expressão da enzima colina acetiltransferase (ChAT), enzima responsável por promover a síntese de ACh (Figura 2) [33]. Todas essas modificações citadas acima promovem prejuízo cognitivo e perda de memória [29,30].

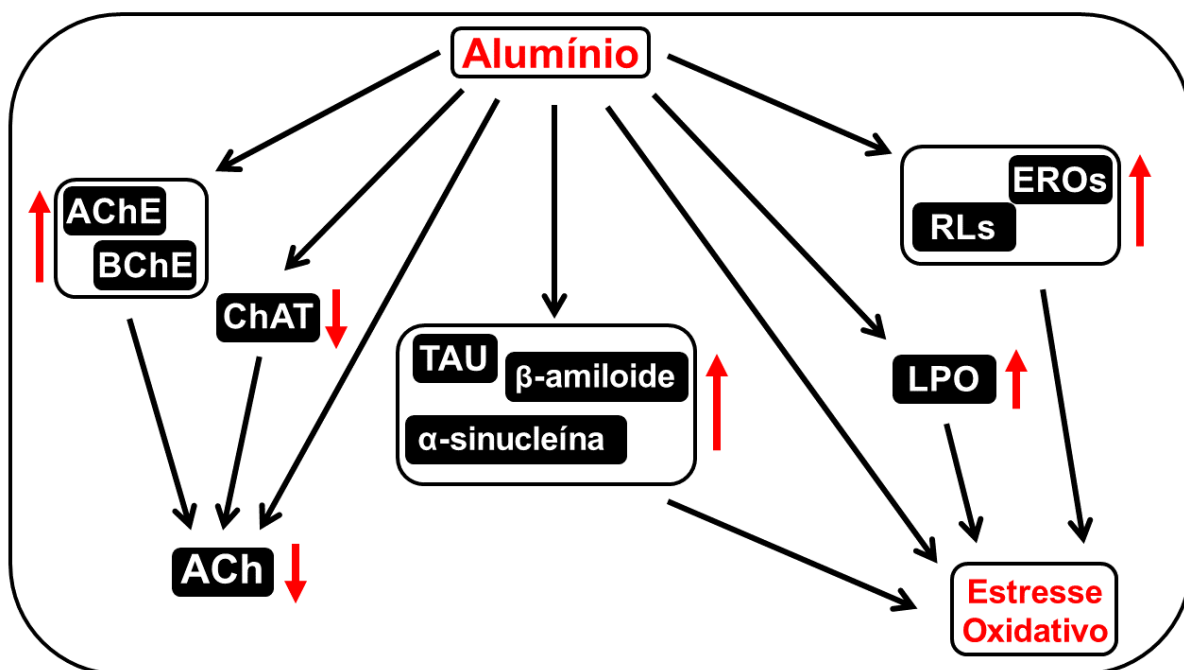


Figura 2: Diferentes vias de atuação do Al, promovendo disfunções no sistema colinérgico, aumentando a expressão de proteínas importantes para o acometimento e progressão de DNs e alteração do estado redox, aumentando a produção de RLs e EROs que levam à LPO e ao estresse oxidativo.

O Al também possui a capacidade de interação com os fosfolipídios de membrana, mudando propriedades físicas, tais como, fluidez lipídica e potencial de superfície [34,35], peroxidação lipídica (LPO, do inglês lipid peroxidation), através do aumento da produção de radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como a aceleração do processo de LPO induzida por ferro, aumentando os níveis de malondialdeído (MDA), a principal espécie reativa, que são formadas durante o processo de LPO (Figura 2) [26,36,37].

Dentre as vias aos quais o Al está associado às DNs, há o estresse oxidativo, sobrecarregando a atividade das enzimas do sistema antioxidante que responsáveis por manter o equilíbrio entre a produção e metabolização dos RLs e EROs [38,39]. O Al também promove disfunção mitocondrial, alterando a produção energética e aumentando a produção dos RLs e das EROs [40].

1.3. Radicais livres e estresse oxidativo

Os RLs são quaisquer espécies, átomos, íons e moléculas químicas, que possuam elétrons em número ímpar ou desemparelhado e a principal fonte de formação nos sistemas biológicos é o oxigênio (O_2) [41]. É bem estabelecido que o O_2 é importante para as vias de metabolismo celular e produção energética [42]. Durante o metabolismo do O_2 , ocorre a produção de agentes altamente reativos com potencial de causar danos significativos aos tecidos biológicos [43,44].

As EROs possuem um papel fundamental e importante em processos fisiológicos e fisiopatológicos dos seres vivos. Das diversas vias pelas quais as EROs e os RLs podem ser formados, as principais ocorrem na mitocôndria (consumindo aproximadamente 90% do O_2 usado pelo corpo humano) e durante a respiração celular e produção energética, no qual o O_2 é reduzido em várias etapas até produzir água (H_2O). Essas reduções formam RLs, destacando-se o ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$) e o radical hidroxila ($^{\circ}OH$) e as EROs como H_2O_2 [45,46,47].

A mitocôndria produz energia através da cadeia transportadora de elétrons e, como supracitado, é onde ocorre a maior formação dos RLs e EROs [48,49]. Há seis principais reações que ocorrem durante a produção energética: 1) redução do O_2 através da adição de 4 elétrons (e^-) e 4 íons de hidrogênio (H^+), formando assim 2 moléculas de H_2O e liberação de energia; 2) Adição de 1 e^- a uma molécula de O_2 ,

formando o radical $O_2^{\circ-}$; 3) Dismutação do $O_2^{\circ-}$, durante o processo recebe íons de H^+ formando H_2O_2 ; 4) Reação de Fenton, quando ocorre a reação entre o H_2O_2 com íons ferro (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^+), formando o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), para esse radical não há sistema enzimático de defesa; 5) Reação de Haber-Weiss, onde o Fe^{2+} ou Cu^+ catalisam a reação entre H_2O_2 e $O_2^{\circ-}$, gerando o $OH^{\bullet}$; 6) A reação entre o $O_2^{\circ-}$ e o óxido nítrico (NO) gerando peroxinitrito ($ONOO^-$), ambos NO e $ONOO^-$ são espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Figura 3) [50,51,52,53,54].

Como descrito anteriormente, os RLs, EROs e ERNs são importantes para o funcionamento fisiológico dos sistemas e, quando ocorre o aumento e acúmulo dessas moléculas, tem-se o estresse oxidativo [43]. O mesmo está associado à diversas fisiopatologias (DNs, câncer, diabetes, hipertensão, obesidade, doenças crônicas de rins e fígado, entre outras) [55,56,57,58,59].

Essas moléculas são formadas continuamente e, para impedir que ocorra o acúmulo e dano, temos os sistemas antioxidantes enzimáticos e o não-enzimáticos. Ambos atuam direta ou indiretamente nas moléculas de RLs, EROs e ERNs, estabilizando-as e mantendo o equilíbrio entre a sua produção e a eliminação [60].

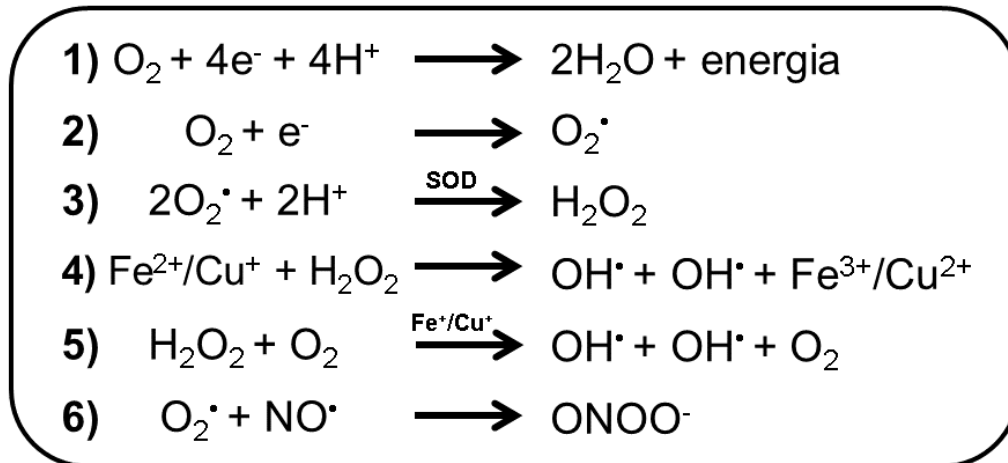


Figura 3: Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons. Exemplificação das reações que formam radicais livres (RLs) e espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Barbosa et al., 2010.

1.4. Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático

O sistema de defesas antioxidantes se constitui em dois: o enzimático e o não-enzimático. No primeiro, temos as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), sendo estas a primeira linha de defesa contra os RLs e as EROs [61]. A enzima SOD, através da dismutação, converte dois $O_2^{\circ-}$

com a adição de dois H^+ formando H_2O_2 . O funcionamento da SOD é essencial, uma vez que o $O_2^{\circ-}$ é mais reativo quando comparado ao H_2O_2 . Já a CAT desempenha um papel importante na eliminação do H_2O_2 , pela catálise de duas moléculas de H_2O_2 em uma molécula de O_2 + e duas moléculas de H_2O . Da mesma forma, a GPx funciona como mecanismo de defesa, convertendo duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSH), removendo o H_2O_2 e formando H_2O (Figura 4) [61,62,63].

A atuação dessas enzimas reduz de forma indireta a formação do radical $OH^\bullet$, este é considerado o mais propício em produzir danos oxidativos, devido seu maior potencial reativo, para esse radical, não há sistema enzimático de defesa, tornando-o um principal agente causador de dano [62,64,65].

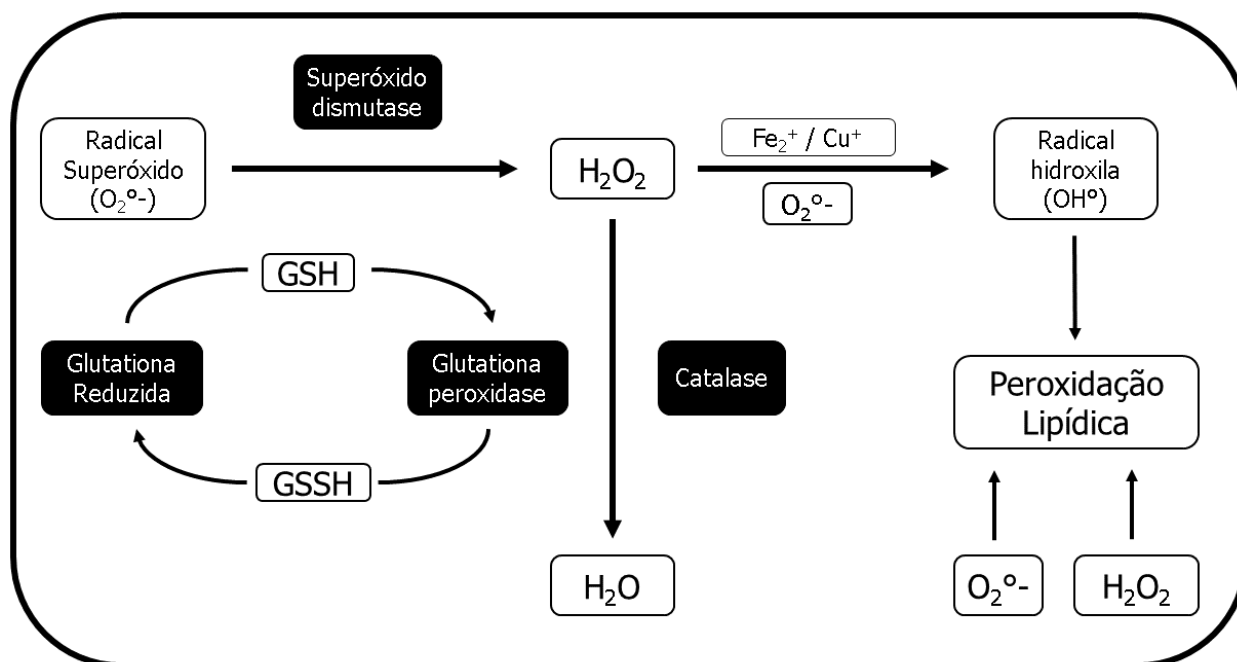


Figura 4: Exemplificação do sistema enzimático antioxidante. Na imagem mostramos os mecanismos das enzimas SOD, CAT e GPx. Exemplifica-se a importância na redução dos RLs e ROS. Adaptado de González et al., 2003.

O sistema de defesa não-enzimático inclui os compostos antioxidantes produzidos pelo organismo (bilirrubina, hormônios sexuais, melatonina, cisteína, coenzima Q, ácido úrico, entre outros) e os que são adquiridos principalmente pela alimentação (produtos naturais e nutracêuticos). Dentre eles, estão as vitaminas - o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A); carotenoides - licopeno, luteína e zeaxantina; minerais - selênio,

magnésio e zinco; flavonoides - quercetina, resveratrol, naringenina, crisina, entre outros [61,66,67,68].

1.5. Nutraceuticos

O conceito de nutraceutico é um híbrido entre “nutrição” e “farmacêutico” estabelecido no ano de 1989 pelo fundador e presidente da fundação de Medicina e Inovação Stephen L. DeFelice [69]. A Associação Europeia de Nutraceuticos (AEN) define os nutraceuticos como “produtos que, além de promover componentes nutricionais, ainda proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças” [70].

Recentemente, uma alteração deste conceito foi proposta para “fitocomplexos derivados de alimentos de origem vegetal ou metabólitos secundários derivados de alimentos de origem animal, concentrados e administrados ou não em forma farmacêutica mais adequada. São capazes de fornecer efeitos benéficos à saúde, incluindo prevenção e/ou tratamento de uma doença”. Os nutraceuticos são representados principalmente por fitoquímicos, vitaminas, minerais, aminoácidos e probióticos [70,71,72].

Conceitos sobre alimentos convencionais, funcionais e suplementos alimentares precisam ser elucidados e diferenciados, para compreender melhor cada uma das atividades dos nutraceuticos.

Alimentos convencionais são fundamentais para os seres vivos, contém componentes essenciais para o funcionamento dos organismos, como produção de energia, fornecimento de nutrientes, suporte de atividades metabólicas, crescimento e manutenção do corpo, mantendo assim os sistemas saudáveis [73,74]

Já os alimentos funcionais são aqueles que podem ser fortificados (adição de maior conteúdo de nutrientes), enriquecidos (incorporação de novos nutrientes), alterados (substituição de nutrientes existentes, por novos com funções benéficas) e aprimorados (alteração na composição de nutrientes por alterações nos alimentos crus), modificações essas com o fim de aumentar os efeitos benéficos dos alimentos [73,74].

Consumido de forma complementar, o uso dos suplementos alimentares têm como objetivo garantir a ingestão de componentes específicos, tais como vitaminas e

minerais, durante um determinado período de tempo. Como os medicamentos, os suplementos alimentares assumem as formas farmacêuticas (pílulas, comprimidos e cápsulas), sendo essa uma diferença marcante com os alimentos funcionais [73,75]

E o último conceito, necessário para compreensão de nutracêuticos é o termo medicamento: onde são produtos que demonstraram cientificamente, em doses recomendadas, modificar as funções fisiológicas, por conter uma 'substância ativa' ou uma mistura de substâncias que exercem uma ação farmacológica, com a finalidade de restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas [73,75].

Como discutido anteriormente, a nutrição tem um papel importante na manutenção e equilíbrio de micro e macronutrientes e os produtos farmacêuticos são usados para tratar sintomas e/ou curar doenças. Logo os nutracêuticos promovem a nutrição além de prevenir ou tratar doenças agudas e crônicas (figura 5) [76].

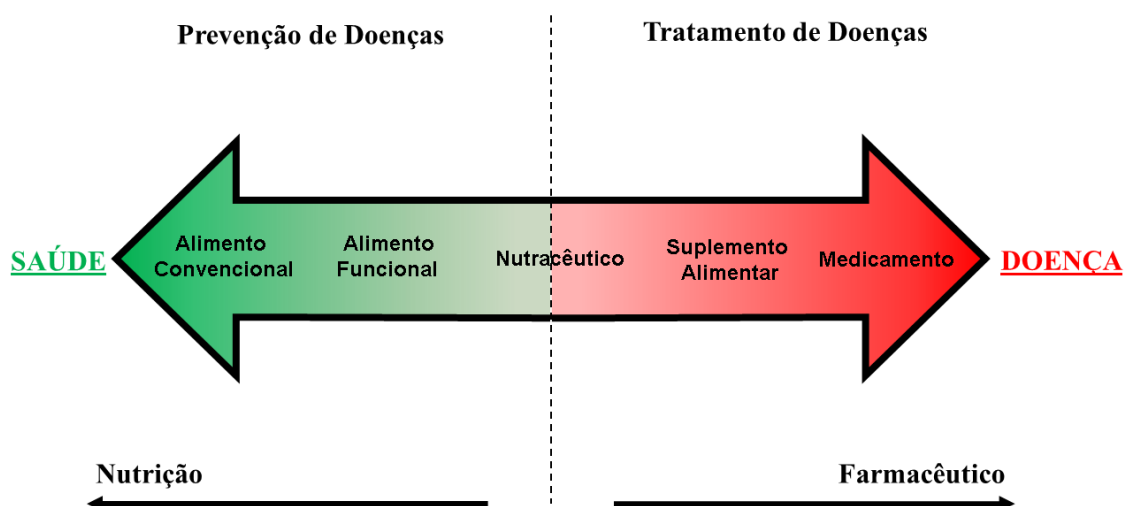


Figura 5: Exemplificação da interface entre o alimento convencional e funcional com o suplemento alimentar e medicamentos e sua relação com os nutracêuticos. Adaptado de Diaz et al., 2019.

De maneira geral, vêm sendo evidenciados os benefícios do uso dos nutracêuticos para a prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas como obesidade, cânceres, artrite, diabetes, hipertensão e DNs como a DP e a DA [77,78,79,80,81]. Dentre as atividades biológicas realizadas pelos nutracêuticos, estão atividades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antiapoptóticas e, a principal delas, a atividade antioxidante [81,82].

1.6. Crisina

Dentre os nutracêuticos estudados atualmente, temos a crisina (5,7-dihidroxi-flavona), que é um fitoquímico da classe dos flavonoides, sendo um dos mais importantes bioativos e facilmente encontrada nas folhas, flores e frutos da *Passiflora* sp. (maracujá), algumas espécies de cogumelos, no própolis e principalmente no mel (figura 6) [83,84,85].

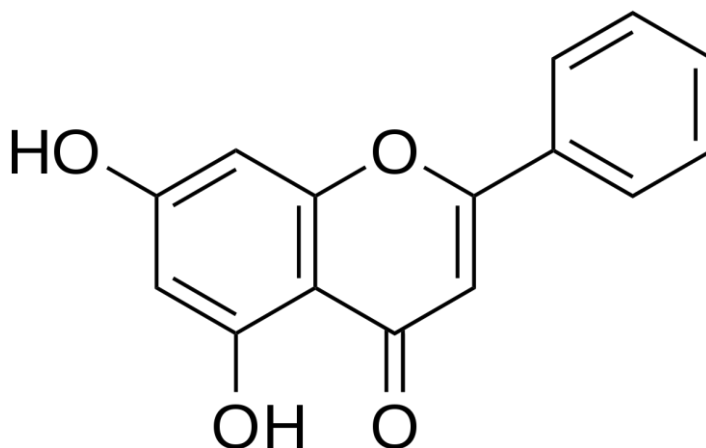


Figura 6: Estrutura química da crisina (5,7-dihidroxi-flavona). Fórmula química: $C_{15}H_{10}O_4$. Peso molecular: 254,24 g/mol. Retirado de Mani e Natesan, 2018.

Diversos estudos mostraram que em diferentes tipos de própolis e mel é possível encontrar grandes quantidades de crisina e que a mesma possui a característica de atravessar a BHE, sugerindo assim que o uso deste flavonoide pode apresentar efeitos a nível de SNC [85,86,87].

Dentre os efeitos biológicos da crisina, estudados até o momento, demonstram atividades antimicrobianas, anticancerígenas, antiapoptóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes [86,88,89,90]. Estudos em modelos animais, utilizando crisina, demonstraram que o uso deste nutracêutico, tiveram efeitos promissores para o tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial e pulmonar, arteriosclerose e diabetes, onde esses efeitos foram associados à sua atuação nas atividades antiapoptóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes [91,92,93].

Estudos demonstraram que a crisina foi capaz de diminuir os níveis de LPO e morte celular na região CA1 do hipocampo e restaurar os efeitos da ansiedade e depressão em modelo experimental animal [87]. Também reverteu os efeitos negativos promovidos pelo modelo de isquemia e reperfusão em ratos, sendo essa

melhora relacionada aos efeitos antiapoptóticos, anti-inflamatórios e antioxidantes [94].

A crisina também protegeu contra a neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (modelo animal para a DP), através do aumento de expressão da transcrição do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), o mesmo é um dos responsáveis pela expressão genica da CAT, SOD e outros genes do sistema antioxidante [95]. Em outro estudo utilizando o modelo de DP induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), mostrou-se que o pré-tratamento com a crisina impediu a inibição das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPX induzida pelo MPTP, bem como diminuição do estresse oxidativo evidenciada pelos menores níveis da LPO [96].

Mesmo com todos os efeitos neuroprotetores evidenciados pela crisina, e todas suas atuações em vias biológicas importantes relacionadas com a progressão e tratamento da neurotoxicidade induzida por diversos xenobióticos, ainda não há estudos mostrando os efeitos benéficos da crisina contra a neurotoxicidade induzida pelo Al.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos protetores *in vivo* e *ex vivo* da crisina contra a neurotoxicidade induzida por AlCl_3 em camundongos Swiss machos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da crisina sobre:

1) Comportamento:

- Atividade exploratória e locomotora.
- Déficit cognitivo causado pela neurotoxicidade induzida pelo AlCl_3 .

2) Parâmetros bioquímicos (córtex cerebral e hipocampo):

- Atividade das enzimas colinesterásicas;
- Marcadores de estresse oxidativo: lipoperoxidação lipídica, proteínas carboniladas, atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase.

3) Histomorfologia (córtex cerebral e hipocampo):

- Frequência de neurônios necróticos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Drogas e reagentes

AlCl_3 , crisina (figura 6), ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA), H_2O_2 , acetiltiocolina (ATCh), butiriltiocolina (BTCh), ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), malondialdeído (MDA), bitartarato de epinefrina, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecilsulfato de sódio (SDS), eosina, hematoxilina e albumina sérica (BSA) foram obtidos da Sigma Chemical® (St. Louis, MO, EUA). O álcool n-butílico foi obtido através do Synth®; a glicina foi obtida através do Vetec®; o azul de comassie foi obtido através da Amresco; o Fosfato monossódico - NaH_2PO_4 e Fosfato dissódico - Na_2HPO_4 foram obtidos através da Cromoline®. Todos os outros produtos químicos foram obtidos em grau analítico ou de fornecedores comerciais padrão.

3.2. Experimentos *in vivo*

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 9 semanas de idade, pesando em média 40 g cada. Foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e mantidos em condições controladas, com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG sob o número de protocolo CEUA/UFG nº 053/2016.

3.2.2. Protocolo experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (N amostral entre 14 - 16):

- Grupo controle;
- Grupo com cloreto de alumínio 100 mg/kg (AlCl_3);
- Grupos crisina 10 mg/kg (Crisina 10);
- Grupo crisina 30 mg/kg (Crisina 30);
- Grupo crisina 100 mg/kg (Crisina 100).

O grupo controle recebeu água destilada (Veículo do AlCl_3), enquanto os demais grupos receberam AlCl_3 na dose de 100 mg/kg por 90 dias consecutivos

(tratamento 1). A partir do 46º dia, os grupos controle e AlCl_3 passaram a receber também solução salina normal (Veículo da crisina - pH 7,4 ajustado) enquanto os outros três grupos foram administrados as doses de 10, 30 e 100 mg/kg de crisina, até o 90º dia (tratamento 2). Todos os tratamentos foram administrados diariamente por gavagem em um volume de 10 μL / 10 g (figura 7).

As doses de crisina foram selecionadas com base nos trabalhos de Sarkaki et al. [97] e He et al. [98]. A dose de alumínio e a quantidade de dias do tratamento foram escolhidos com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa [99,100].

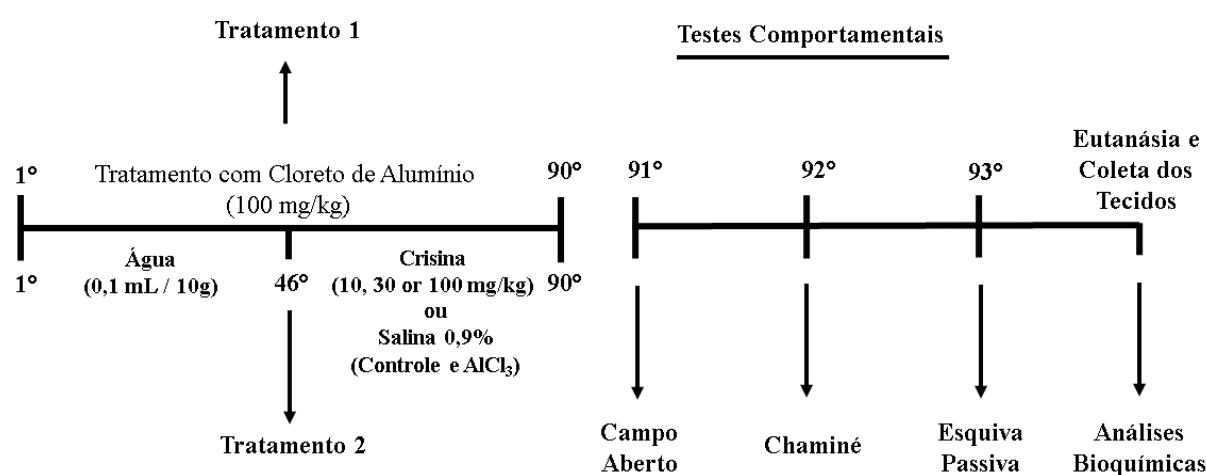


Figura 7: Exemplificação do delineamento experimental para os tratamentos dos animais. À esquerda está representado o tratamento 1, onde todos os grupos recebem do 1º ao 90º dia, AlCl_3 (100 mg/kg) com exceção do grupo controle que recebe água destilada, e o tratamento 2, onde a partir do 46º os grupos controle e AlCl_3 recebem solução salina normal e o restante dos grupos receberam as respectivas doses de crisina 10, 30 e 100 mg/kg. À direita estão organizados os testes comportamentais e coleta de material para testes bioquímicos.

Ao final dos testes comportamentais, as quantidades de animais por grupo foram subdivididas para os ensaios bioquímicos ($n = 8$) e as análises histopatológica e morfométrica ($n = 5$).

3.3. Testes comportamentais

3.3.1. Teste de campo aberto (CA)

Para o teste de CA, os animais foram individualmente colocados ao centro do aparato do campo, que possui diâmetro de 37 cm no total. O centro é dividido em oito quadrantes de área igual formando três círculos concêntricos. A atividade exploratória

e locomotora dos animais foram observadas e gravadas por 5 minutos, a partir da quantificação do total de vezes em que os animais atravessaram os quadrantes com as 4 patas [101] (figura 8).

3.3.2. Teste de chaminé (CM)

Para a avaliação do teste de CM, os animais foram colocados dentro de um tubo cilíndrico transparente (3 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento) disposto horizontalmente em relação à bancada e, ao chegarem à extremidade oposta, ergueu-se o tubo, reposicionando-o verticalmente e formando uma chaminé, com o animal na base da mesma. O teste avaliou o tempo que os animais levaram para subir em marcha ré, até atingir uma linha previamente demarcada, dentro do tempo máximo de 30 s. Com isso, é possível quantificar sua capacidade locomotora, além de complementar os resultados do teste de campo aberto [102] (figura 8).

3.3.3. Teste de esquiva passiva (EP)

Para a avaliação de memória de longo prazo foi utilizado o comportamento de esquiva passiva, baseado no reforço negativo. O aparato consiste em uma caixa (30 x 20 x 20 cm) composta por três paredes de aço inoxidável e uma de acrílico. Dentro dele há duas áreas, a base ou plataforma de segurança (8,0 x 1,5 x 20 cm) na extremidade direita (suspensa), e a outra área de grade (22 x 20 cm), consistindo em uma série de barras de aço inoxidável, separadas de 1 em 1 cm, e conectadas a um gerador elétrico.

Primeiramente os animais passaram pelo treinamento, onde cada camundongo foi colocado na plataforma de segurança, e registrado a quantidade de tempo em que eles permaneceram na plataforma, até o momento em que eles desciam colocando as quatro patas na grade, quando um choque de 0,5 mA foi aplicado pelo experimentador, em aproximadamente 5 s, os animais foram removidos do aparato. Após 24 h do treinamento, os animais foram novamente colocados na plataforma de segurança e o tempo de latência ao descer para a área de grade foi registrado. Nesta etapa, os animais não foram submetidos ao choque enquanto permaneciam na área da grade. Para a sessão teste, os animais foram avaliados pelo tempo máximo de 5

min, ao término eram retirados e para seu tempo de latência foram considerados os 5 min [103] (figura 8).

3.4. Experimentos *ex vivo*

3.4.1. Coleta e preparação do tecido

No dia seguinte ao termino dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) administrada intraperitonealmente. Os animais foram eutanasiados, os cérebros coletados e dissecados, reservando-se o córtex cerebral e o hipocampo. Logo após, o material biológico coletado foi colocado em nitrogênio líquido para preservar sua integridade até o processamento de todas as amostras.

Posteriormente, os tecidos foram imersos em tampão fosfato de potássio (pH 7,4, ajustado), na proporção de 1:6 (p/v) e homogeneizados em equipamento para este fim (Homo mix®). As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 min em temperatura de 4°C; tanto o sobrenadante (S1) quanto o homogeneizado total (HT) foram coletados e armazenados em freezer a -80°C, até a realização das dosagens bioquímicas.

3.5. Testes bioquímicos

3.5.1. Atividades das colinesterases (ChEs)

A quantificação das atividades da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase foi realizada através do método de Ellman et al. 1969 [104]. Essa metodologia constitui-se na avaliação colorimétrica da taxa de produção do ânion 5-tio-2-nitrobenzóico que possui cor amarela, que é produzido proporcionalmente às concentrações de acetiltiocolina (ATCh) ou da butiriltiocolina (BTCh) que são análogas à ACh e BCh [105,106].

A enzimas AChE e BChE hidrolizam as moléculas de ATCh e BTCh em acetato e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com o 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) resultando na produção do 5-tio-2-nitrobenzoato, detectado espectrofotometricamente a 412 nm.

Para a realização do teste, as amostras de S1 do córtex e hipocampo foram diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) na proporção de 1:50. Logo, foram incubados com 1,8 µL de DTNB (0,3 mM) e 1,5 µL de ATCh (10 mM) ou BTCh (10 mM) em um volume final de 200 µL da amostra diluída. As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas durante um período de 10 min, com leituras em intervalos de 1 min. Os dados foram expressos em µmol de ATCh/min/mg de proteína e µmol de BTCh/min/mg de proteínas.

3.5.2. Níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Para avaliar os níveis de peroxidação lipídica no córtex e hipocampo, foi utilizada a metodologia de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Ohkawa et al. (1979) e Tsikas (2016) [107,108], com algumas adaptações. Os níveis de peroxidação lipídica aumentam proporcionalmente com o dos RL e EROs, levando à formação de MDA, que é quantificado nesta metodologia [109,110]. Para a reação foram adicionadas as frações S1 das amostras, o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8% (p/v), o ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8% (p/v). A mistura foi aquecida a 95 °C por 60 minutos. Em meio ácido e aquecido, o MDA presente na amostra se liga ao TBA formando um cromogênio de cor rosa. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi pipetado na placa e lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm. O resultado obtido foi expresso em equivalente de MDA em nmol/mg de proteína.

3.5.3. Níveis de proteínas carboniladas (PC)

As proteínas carboniladas são proteínas com estruturas modificadas devido à adição de um grupo carbonil principalmente pela via da oxidação de resíduos de aminoácidos, evocada pelo aumento dos RLs e EROs [111]. Os níveis de proteínas carboniladas foram medidos seguindo os métodos descrito por Levine et al. (1990) e Colombo et al. (2015) [112,113], com modificações.

As frações HT foram incubadas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) preparado com uma solução de HCl a 2 M. A mistura foi mantida no escuro por 1 h, sendo agitada em vórtex a cada 15 min. Após a incubação inicial, foi adicionado o tampão de

desnaturação (SDS, 10%) e homogeneizado por 10 s e, subsequente à adição de etanol e hexano (1:1 v / v), cada amostra foi agitada em vórtice por 40 s e centrifugada a 4000 RPM por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com etanol e acetato de etila (1:1 v/v) e ressuspenso em tampão de desnaturação. A amostra foi agitada em vórtice por 5 min e pipetada em placa para a leitura em espectrofotômetro, na absorbância de 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de proteínas carboniladas / mg de proteína.

3.5.4. Atividades da enzima superóxido dismutase (SOD)

A SOD atua convertendo o radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 reduzindo os danos promovidos por ele [114]. Para avaliar a atividade enzimática da SOD, foi utilizada a metodologia descrita por Miao et al., (2009) e Misra e Fridovich (1979) [114,115], com modificações. A técnica é baseada na formação do adenocromo, proveniente da inibição da reação do $O_2^{\bullet-}$ com a adrenalina. A SOD presente na amostra, compete pelo $O_2^{\bullet-}$ com o sistema de detecção. Para a reação, utilizou-se as frações de S1 do córtex e do hipocampo, ao qual foi adicionado o tampão de glicina (50 mM, pH 10,0). Posteriormente, foi adicionado a solução de bitartarato de adrenalina (60 mM, pH 2,0) dando-se início à reação de cinética enzimática por 10 min, realizando-se leituras em espectrofotômetro com intervalos de 1 min, no comprimento de onda de 480 nm. O resultado foi expresso em unidades (U) de SOD / mg de proteínas.

3.5.5. Atividade da enzima catalase (CAT)

A CAT atua convertendo o H_2O_2 em H_2O e O_2 [116]. Para determinação da sua atividade foi utilizada a metodologia descrita por Aebi (1978) [117], com modificações. Foram adicionados na placa de leitura o tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e a fração S1 das amostras de córtex ou hipocampo. Por fim, foi adicionado à reação o H_2O_2 (86 mM). A decomposição do H_2O_2 é diretamente proporcional à atividade da CAT presente nas amostras, a qual é mensurada em espectrofotômetro por 5 min com leituras em intervalo de 15 em 15 s, no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em U de CAT / mg de proteína.

3.5.6. Determinação da quantidade de proteínas

O conteúdo total de proteínas presentes nas frações S1 e HT foram quantificadas através do método descrito por Bradford (1976) [118], com modificações. Foi utilizada uma curva padrão de albumina bovina sérica (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) para determinar a quantidade de proteínas presente nas amostras.

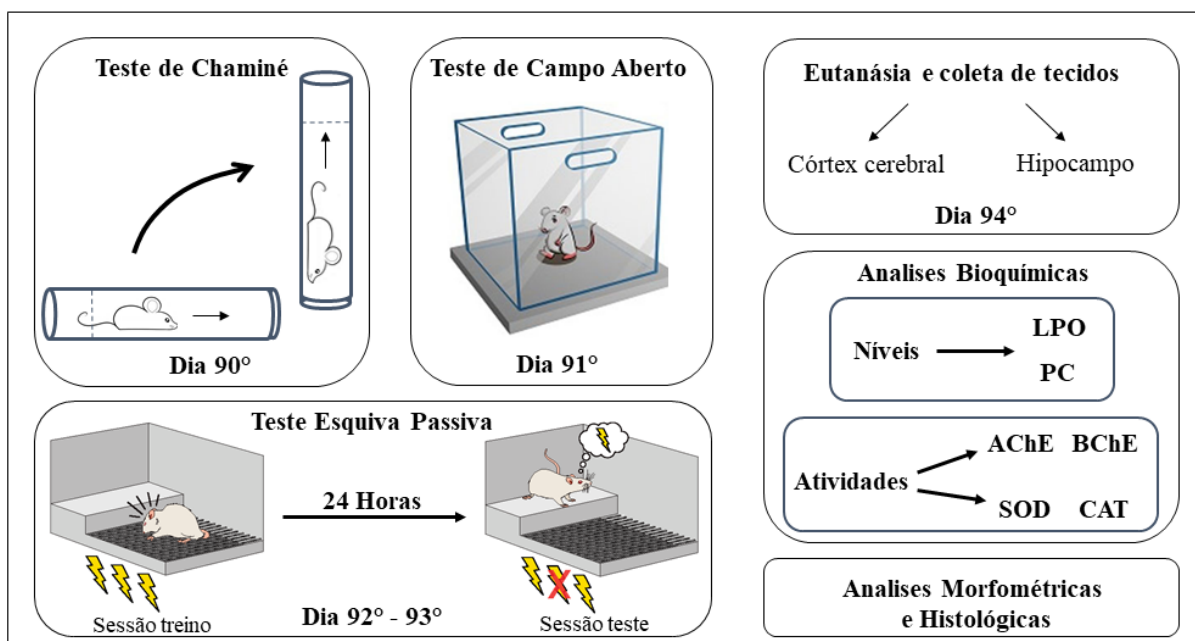


Figura 8: Exemplificação do protocolo experimental para os experimentos comportamentais. O teste de chaminé realizado no 90º dia, o teste de campo aberto no 91º dia e o teste de esquiva passiva no 92º e 93º. Juntamente com a sequencia das análises bioquímicas, histopatológicas e morfométricas, realizadas *ex vivo*.

3.6. Análises histopatológicas e morfométricas

Córtex cerebral e hipocampo foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% (tamponado em fosfato 0,1 M pH 7,2) por 24h. Os tecidos foram desidratados em uma série crescente de concentrações de etanol, clarificados em xilol, embebidos em paraplast (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemanha) e seccionados a 5 µm em um micrótomo (Leica® RM2155, Nussloch, Alemanha). As secções foram coradas por tionina acética e analisadas no microscópio Zeiss Axioscope A1 (Zeiss®, Alemanha). Análises morfométricas foram realizadas para quantificar a neurodegeneração em termos de porcentagem (%) de neurônios eosinofílicos (células semelhantes à necrose) no córtex cerebral e hipocampo (área CA1). Para isto, 30 fotomicrografias foram obtidas (6 campos/animal, n=5 animais/grupo). A porcentagem de neurônios necróticos foi obtida em relação ao número total de neurônios por fotomicrografia.

Todas as análises foram realizadas manualmente por duplo cego, usando o programa Image Pro-Plus v. 6.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA).

3.7. Análise estatística e apresentação dos dados

Os dados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (EPM). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguidos pelos pós-testes de Newman-Keuls ou Dunnett, para comparação entre 3 grupos ou mais. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, versão 8.0).

4. Resultados

4.1. Resultados dos testes *in vivo*

4.1.1. Testes comportamentais

4.1.2. Testes de Campo aberto (CA) e Chaminé (CM)

O desempenho dos camundongos nos testes de CA e CM estão apresentados na Tabela 1. Para ambos os testes, não foram observadas diferenças nas atividades locomotoras espontânea ($p > 0,05$) ou exploratória ($p > 0,05$), indicando que nenhum dos tratamentos promoveram alterações nas atividades locomotoras dos animais.

Tabela 1: Atividades exploratória e locomotora

Grupos	Campo aberto (num)	Chaminé (s)
	Cruzamentos	Escalada
Controle	102.0 $\pm$ 5.30	13.92 $\pm$ 2.08
AlCl ₃	110.8 $\pm$ 11.51	15.70 $\pm$ 3.05
Crisina 10	109.6 $\pm$ 19.21	16.16 $\pm$ 1.69
Crisina 30	115.4 $\pm$ 23.35	16.44 $\pm$ 2.08
Crisina 100	107.8 $\pm$ 12.97	15.14 $\pm$ 2.25

Tabela 1: Atividades exploratória e locomotora dos camundongos submetidos aos testes de CA e CM. Dados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. para o N amostral entre 14 -16 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) para ambos os testes.

4.1.3. Teste de Esquiva Passiva (EP)

O resultado do desempenho dos animais no teste de EP é apresentado na Figura 9. Para a fase de treino não houveram diferenças entre os grupos ($p = 0,7843$). Vinte e quatro horas após a sessão treino, os resultados mostraram que os animais do grupo AlCl₃ apresentaram um menor tempo de latência.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,001$) na sessão teste. As comparações pós-teste revelaram que o grupo AlCl₃ apresentou menor tempo de latência de transferência (~87%), quando comparado ao grupo controle. O tratamento com crisina em todas as doses testadas (10, 30 e 100 mg / kg) reduziu esse comprometimento ($p = 0,031$, $p = 0,037$ e $p = 0,032$, respectivamente).

Todas as doses de crisina testadas não apresentaram diferenças quando comparadas entre si ($p > 0,05$).

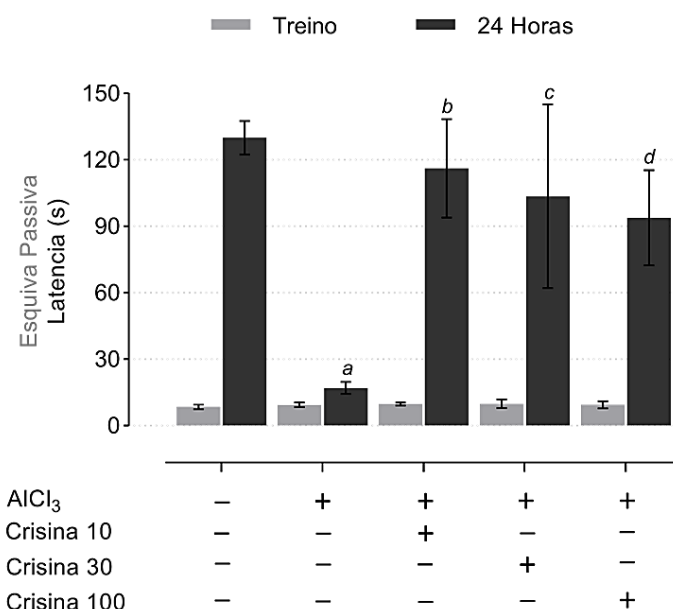


Figura 9: Efeitos dos tratamentos sobre o prejuízo de memória induzido pelo AlCl₃, no teste de esquiva passiva. Dados são apresentados como a média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 14 a 16 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ^a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle; ^b $p = 0.0310$ quando comparado ao grupo AlCl₃. ^c $p = 0.0370$ quando comparado ao grupo AlCl₃. ^d $p = 0.0320$ quando comparado ao grupo AlCl₃.

4.2. Resultados ex vivo

4.2.1. Testes bioquímicos

4.2.2. Atividades das colinesterases (ChEs)

A atividade da AChE no córtex cerebral e no hipocampo são apresentadas na Figura 10. As análises estatísticas para a atividade da AChE no córtex cerebral não apresentou diferença significativa entre os grupos. Diferentemente, no hipocampo houveram diferenças entre os grupos ($p = 0,001$). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou ($\sim 38\%$) a atividade da AChE no hipocampo, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os tratamentos com crisina em todas as doses estudadas reduziu este aumento quando comparado ao grupo AlCl₃ ($p < 0,05$),

e não apresentaram diferenças com o grupo controle ($p > 0,05$). Não houveram diferenças estatísticas quando comparado entre as doses de crisina.

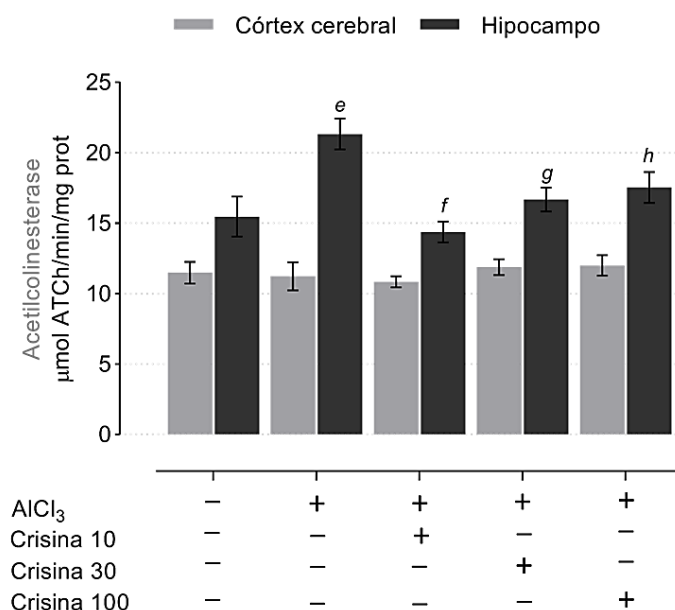


Figura 10: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e no hipocampo sobre a atividade da AChE em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados estão representados como a média $\pm$ E.P.M. para o n amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ^e $p = 0,0013$ quando comparado ao grupo controle; ^f $p = 0,0118$, ^g $p = 0,0187$ e ^h $p = 0,0215$ quando comparado ao grupo AlCl₃ para a atividade da AChE no hipocampo.

A atividade da BChE no córtex cerebral e no hipocampo são apresentadas na Figura 11. A análise estatística no córtex cerebral não mostrou diferença significativa entre os grupos, entretanto, no hipocampo mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,001$). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~31%) a atividade da BChE no hipocampo quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com crisina em todas as doses testadas evitou este aumento quando comparado ao grupo AlCl₃ ($p < 0,05$), e não apresentaram diferenças com o grupo controle ($p > 0,05$). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as doses testadas.

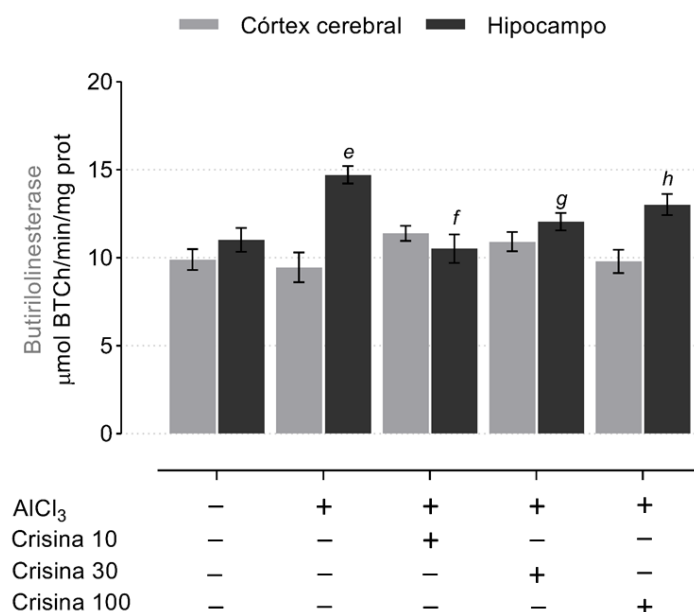


Figura 11: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e no hipocampo sobre a atividade da BChE em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados estão representados como a média $\pm$ E.P.M. para o n amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey; ^e $p < 0,0002$, quando comparado ao grupo controle. ^f $p = 0,0111$, ^g $p = 0,0115$ e ^h $p = 0,0194$ quando comparado ao grupo AlCl₃ para a atividade da BChE no hipocampo.

4.2.3. Níveis de Lipoperoxidação lipídica (LPO)

Os níveis de LPO do córtex cerebral e hipocampo são apresentados na Figura 12. A análise estatística dos níveis de LPO no córtex cerebral mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,002$). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou ($\sim 97\%$) os níveis de LPO no córtex cerebral quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com crisina em todas as doses testadas evitou este aumento quando comparado ao grupo AlCl₃ ($p < 0,05$), e não apresentaram diferenças com o grupo controle ($p > 0,05$).

Para os níveis de LPO no hipocampo, a estatística mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0001$). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou ($\sim 48\%$) os níveis de LPO no hipocampo quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com crisina em todas as doses testadas evitou este aumento quando comparado ao grupo AlCl₃ ($p < 0,05$), e não apresentaram diferenças com o grupo controle ($p > 0,05$). Não houveram diferenças estatísticas quando comparado entre as doses de crisina.

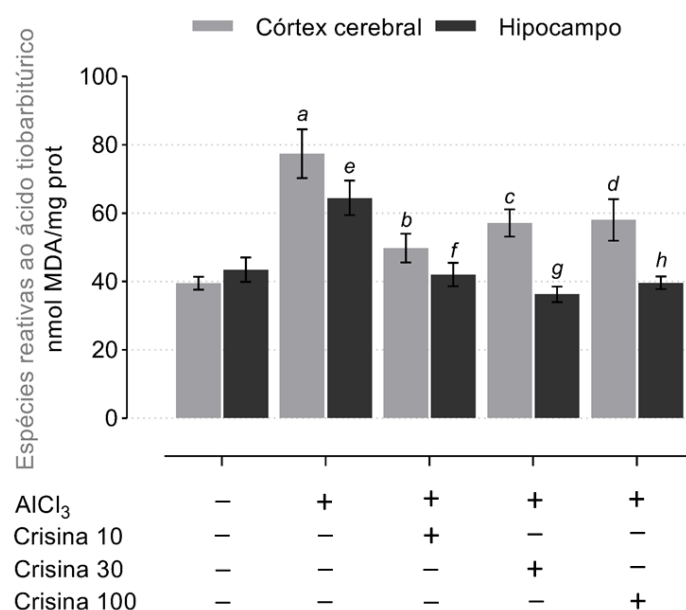


Figura 12: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre os níveis de LPO em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a p ≤ 0,0001 quando comparado ao grupo controle, ^b p ≤ 0,001, ^c p = 0,032 e ^d p = 0,010 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de MDA no córtex cerebral; ^e p = 0,0005 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,0002, ^g p = 0,0001 e ^h p = 0,0001 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de MDA no hipocampo.

4.2.4. Níveis de proteínas carboniladas (PC)

Os níveis de PC do córtex cerebral e hipocampo são apresentados na Figura 13. A análise estatística dos níveis de PC no córtex cerebral mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,0167). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~ 31%) os níveis de PC no córtex cerebral quando comparado ao grupo controle (p < 0,05). O tratamento com crisina não conseguiu prevenir este aumento no córtex cerebral.

A análise estatística dos níveis de PC do hipocampo mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,004). As comparações pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~ 36%) os níveis de PC do hipocampo quando comparado ao grupo controle (p < 0,05). O tratamento com crisina, em todas as doses testadas, evitou este aumento no hipocampo quando comparado ao grupo AlCl₃ (p < 0,05), e não apresentaram diferenças com o grupo controle (p > 0,05). Além disso, não houveram diferenças estatísticas entre os tratamentos com crisina (p > 0,05).

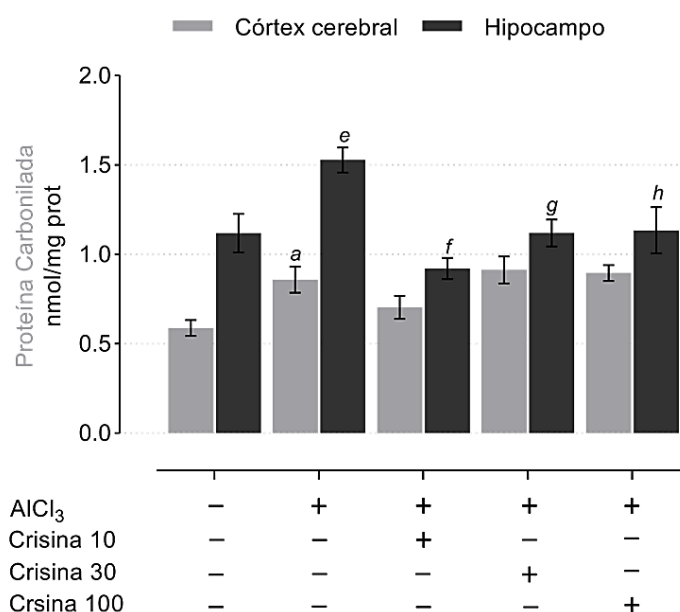


Figura 13: Efeito dos tratamento no córtex cerebral e hipocampo sobre os níveis de PC em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a p = 0,0001 quando comparado ao grupo controle para os níveis de CP no córtex cerebral; ^e p = 0,0153 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,001, ^g p = 0,027 e ^h p = 0,021 quando comparado ao grupo AlCl₃, para os níveis de PC do hipocampo.

4.2.5. Atividades da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD no córtex cerebral e no hipocampo são apresentadas na Figura 14. A análise estatística das atividades da SOD no córtex cerebral mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,0001). As comparações pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~ 70%) a atividade da SOD no córtex cerebral quando comparado ao grupo de controle (p < 0,05). Os tratamentos com crisina em todas as doses estudadas reduziram esse aumento quando comparado ao grupo AlCl₃ (p < 0,05), e não apresentaram diferenças entre o grupo controle (p > 0,05). Além disso, não houveram diferenças estatísticas entre as doses (p > 0,05).

A análise estatística da atividade da SOD no hipocampo mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,0001). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ inibiu (~ 28%) da atividade da SOD no hipocampo quando comparado ao grupo controle (p < 0,05). Os tratamentos com a crisina em todas as doses estudadas atenuaram esta inibição quando comparado ao grupo AlCl₃ (p < 0,05), e não

apresentaram diferenças com o grupo controle ($p > 0,05$). Além disso, não foram encontradas diferenças entre as doses de crisina utilizadas ($p > 0,05$).

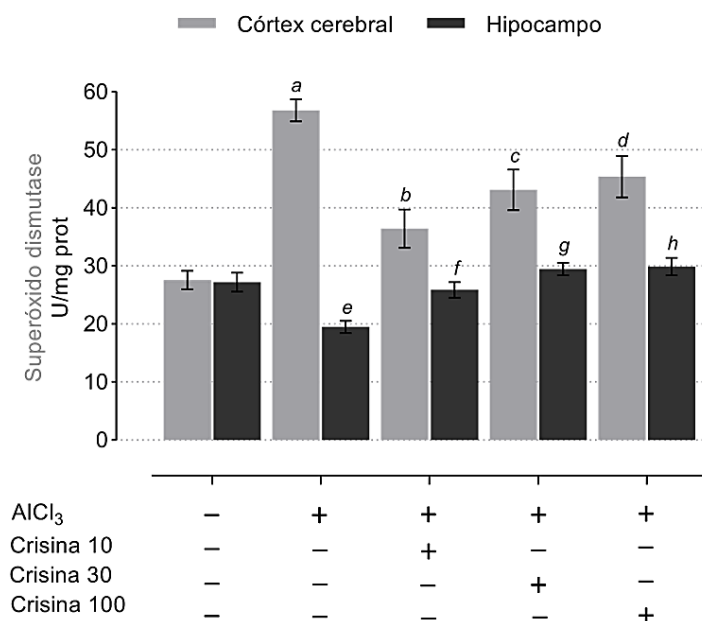


Figura 14: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre a atividade da SOD em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a $p = 0,0001$, quando comparado ao grupo controle; ^b $p = 0,0014$, ^c $p = 0,0385$ e ^d $p = 0,0395$, quando comparado ao grupo AlCl₃, para as atividades da SOD no córtex cerebral; ^e $p = 0,0015$ quando comparado ao grupo controle; ^f $p = 0,0084$, ^g $p = 0,0001$ e ^h $p = 0,0001$ quando comparado ao grupo AlCl₃, para as atividades da SOD no hipocampo.

4.2.6. Atividades da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT no córtex cerebral e hipocampo são apresentadas na Figura 15. A análise estatística da atividade da CAT no córtex cerebral não mostrou nenhuma diferença entre os grupos ($p > 0,05$). A análise estatística da atividade da CAT no hipocampo mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0001$). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ inibiu ($\sim 30\%$) a atividade da CAT no hipocampo quando comparada ao grupo controle. O tratamento com crisina em todas as doses testadas diminuiu esta inibição quando comparado ao grupo AlCl₃ ($p < 0,05$), e não apresentaram diferenças entre o grupo controle ($p > 0,05$). Além disso, não houveram diferenças estatísticas entre as doses de crisina estudadas ($p > 0,05$).

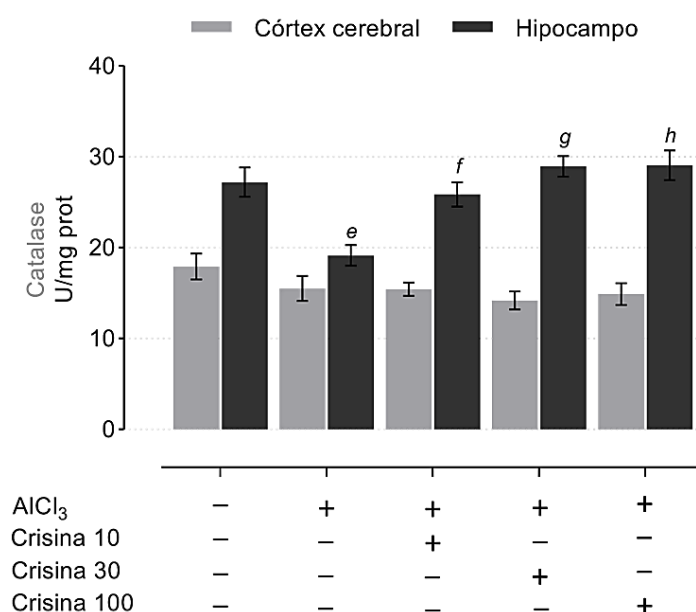


Figura 15: Efeito dos tratamentos no córtex cerebral e hipocampo sobre a atividade da CAT em camundongos tratados com AlCl₃. Os dados são representados como média ± E.P.M. para o N amostral de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^e p = 0,0012 quando comparado ao grupo controle; ^f p = 0,0064, ^g p = 0,0001 e ^h p = 0,0002 quando comparado ao grupo AlCl₃, para as atividades da CAT no hipocampo.

4.3. Análises histopatológicas e morfométricas

A análise histopatológica mostrou que a exposição ao AlCl₃ induziu danos tecidos do córtex cerebral e do hipocampo, causando um aumento na incidência de necrose neuronal. Morfologicamente, todos os tratamentos com crisina diminuíram a ocorrência de neurônios com o fenótipo de necrose eosinofílica (Figura 17). As porcentagens (%) da frequência das células necróticas no córtex cerebral e no hipocampo são apresentadas na Figura 16. A análise estatística da frequência de células necróticas no córtex cerebral mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,001). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~ 230%) a frequência de células necróticas do córtex cerebral quando comparado ao grupo controle. O tratamento com crisina em todas as doses testadas evitou este aumento. A análise estatística da frequência de células necróticas no hipocampo CA1 mostrou diferença significativa entre os grupos (p = 0,002). As comparações do pós-teste revelaram que o AlCl₃ aumentou (~ 120%) a frequência de células necróticas no

hipocampo quando comparado ao grupo controle. Todos os tratamentos com crisina evitaram este aumento.

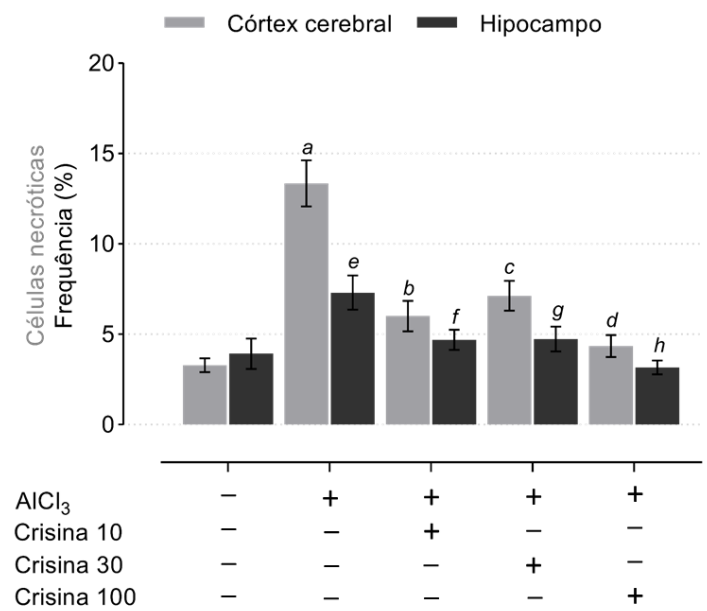


Figura 16: Frequência de neurônios necróticos no córtex cerebral e hipocampo. Os dados são representados como média $\pm$ E.P.M. para o N amostral de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a $p = 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; ^b $p = 0,0001$, ^c $p = 0,0001$ e ^d $p = 0,0001$ quando comparado ao grupo AICl₃, para frequência de células necróticas no córtex cerebral. ^e $p = 0,0041$ quando comparado ao grupo controle; ^f $p = 0,0334$, ^g $p = 0,0387$ e ^h $p = 0,0003$ quando comparado ao grupo AICl₃, para frequência de células necróticas no hipocampo.

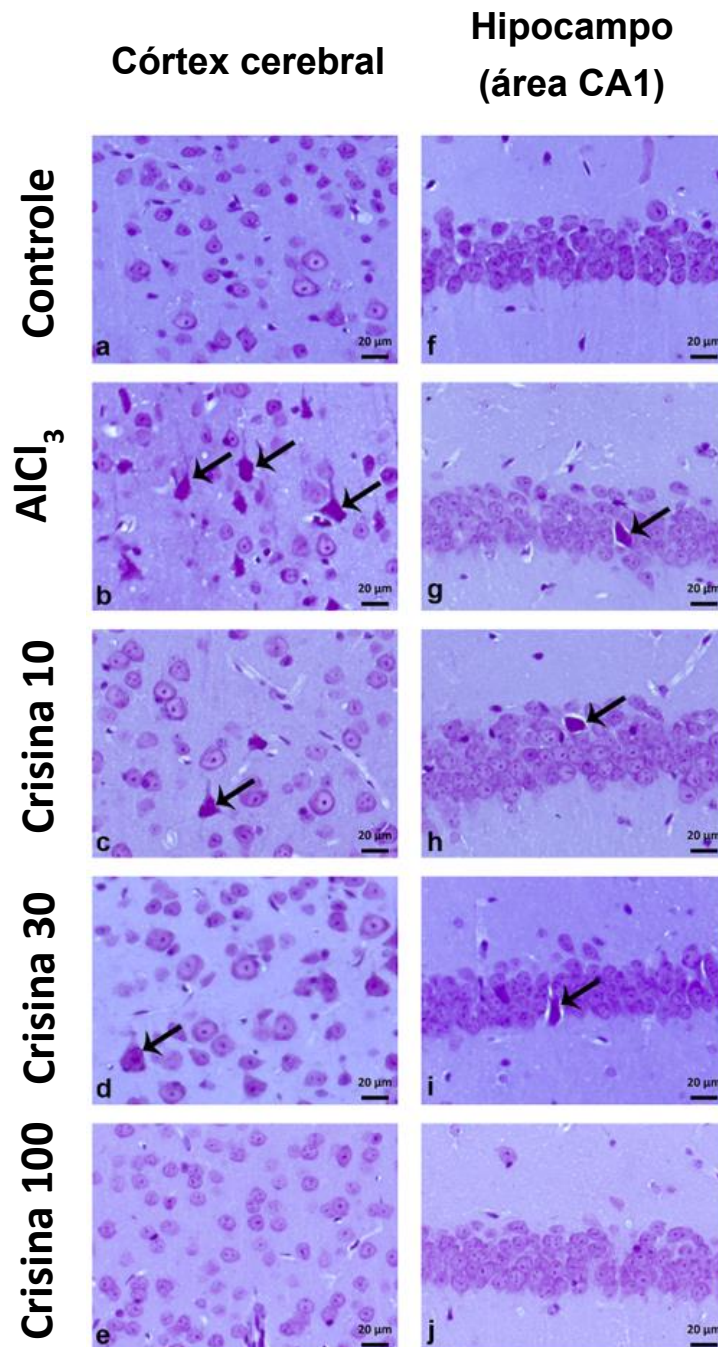


Figura 17: Cortes histológicos do córtex cerebral na região CA1 e do hipocampo. Método de coloração com tionina acética. As setas indicam neurônios em degeneração com aparência de necrose. Esses neurônios se coram intensamente em roxo escuro e mostram degeneração nuclear e citoplasma atrófico. Todos os tratamentos com crisina promoveram uma redução nos neurônios degenerativos tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo.

5. Discussão

No presente estudo, foram demonstrados os efeitos protetores da crisina contra a neurotoxicidade induzida pelo AlCl_3 em camundongos Swiss. Os resultados indicam que a administração oral diária de crisina durante quarenta e cinco dias consecutivos reduziu o comprometimento da memória provocados pelo AlCl_3 . Além disso, a suplementação de crisina também normalizou as atividades da AChE e da BChE no hipocampo, reduziu os níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo e em ambos tecidos a crisina foi capaz de proteger contra a lipoperoxidação lipídica e a morte celular.

É bem conhecido que em doenças neurodegenerativas, como a DA, podem estar presentes danos nas regiões sensoriais e motoras do SNC [119]. Este tipo de deficiência pode induzir resultados falsos quando testes comportamentais de memória são realizados. Para excluir esse fator dos resultados obtidos no estudo, avaliou-se também a atividade locomotora dos animais. O desempenho obtido nos testes de CA e CM mostraram que o tratamento com AlCl_3 não afetou a atividade motora dos animais. Assim, descarta-se a hipótese de interferência do comprometimento motor na avaliação comportamental da memória. Além disso, nenhum efeito do tratamento com AlCl_3 foi observado na fase de aquisição no teste de EP. No entanto, o AlCl_3 afetou a memória não espacial de longo prazo, conforme observado pela diminuição do tempo de latência na plataforma durante a fase de retenção, efeito esse que o tratamento com crisina preveniu nas três doses testadas, mostrando assim seu efeito protetor sobre o comprometimento cognitivo da memória induzido pelo AlCl_3 .

A redução de atividade da ACh cerebral é marcada comumente pela diminuição da atividade da ChAT [120], pelo aumento da atividade da AChE [121,122] e pela perda de neurônios colinérgicos em partes do cérebro, sendo uma das causas mais comuns da demência na DA [123]. Aqui, o AlCl_3 aumentou a atividade da AChE no hipocampo, o que poderia levar ao aumento da hidrólise da ACh e interferir na consolidação da memória, conforme observado no teste de EP. Em um estudo anterior do grupo a que este estudo está vinculado, demonstrou-se que o AlCl_3 induz o aumento na atividade da AChE no cérebro de camundongos após noventa dias de tratamento [99]. No entanto, neste estudo, nenhuma alteração foi observada na atividade da AChE no córtex cerebral, sendo assim, é plausível sugerir que o aumento da atividade da AChE no cérebro está diretamente ligado à estrutura do hipocampo.

Outra enzima responsável pela hidrólise da ACh em um cérebro saudável é a BChE. Da mesma forma, a atividade da BChE no hipocampo aumentou nos animais tratados apenas com AlCl_3 . É bem conhecido que a atividade aumentada da BChE cerebral é uma característica notável da DA e está associada ao desenvolvimento de placas neuríticas corticais no hipocampo na DA [124]. Semelhante aos resultados obtidos com a AChE, foi observado o aumento da atividade da BChE induzido pelo AlCl_3 somente no hipocampo, sendo que esta atividade também foi restabelecida pelo tratamento com a crisina nas três doses utilizadas.

O uso de flavonoides como inibidores das colinesterases (ChEs) como uma terapia alternativa para o tratamento de certos distúrbios, como miastenia gravis, demência por corpos de Lewy e DA tem sido descrito [125]. Além disso, Balkis et al. (2015) [126] mostraram que a crisina inibiu a atividade da AChE *in vitro* em enguias elétricas, enquanto Taslimi et al. (2017) [127] também em testes *in vitro* mostrou que a crisina inibiu a atividade de isoformas humanas da AChE e da BChE. No presente estudo, o tratamento com crisina por quarenta e cinco dias consecutivos restaurou as atividades das ChEs do hipocampo aos níveis normais, estando associado com a melhor performance realizada pelos animais, como foi observado durante a fase de retenção no teste de EP. Este efeito, pode estar associado à preservação da memória pela crisina observada no teste de EP.

Está bem estabelecido que o Al induz estresse oxidativo, promove a formação de EROs e eleva a LPO em diferentes tecidos, o que pode levar a danos na membrana [128]. Os resultados aqui obtidos, mostraram que a exposição ao AlCl_3 induziu LPO e, assim sendo, evidenciando que o tecido cerebral sofreu danos oxidativos, tanto no córtex cerebral como no hipocampo. Satisfatoriamente, o tratamento com crisina evitou esse aumento, mostrando que este composto apresenta propriedades antioxidantes que são capazes de inibir a LPO cerebral induzida pelo AlCl_3 .

Na literatura, tem-se descrito que vários flavonoides, incluindo a crisina, promovem a ação antioxidante na proximidade das ligações duplas dos fosfolípidos da membrana celular [129,130] sendo, portanto, já esperado que a crisina inibisse a lipoperoxidação devido às suas propriedades antioxidantes previamente relatadas.

Junto com a elevação da LPO, a formação de ROS promove a oxidação de proteínas, levando à formação de uma variedade de espécies de carbonilas. Aqui, os

animais expostos ao AlCl_3 apresentaram níveis elevados de PC em ambas as estruturas cerebrais quando comparado ao controle, indicando que a toxicidade do Al leva à oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e modificações de proteínas. O tratamento com crisina evitou essas modificações proteicas, uma vez que a carbonilação de proteínas é uma das modificações oxidativas irreversíveis mais prejudiciais e por um processo não enzimático [131]. Podemos atribuir esse efeito às propriedades antioxidantes da crisina regulando o estresse oxidativo no SNC. Desta forma e conhecendo os papéis fisiopatológicos das proteínas carboniladas, é possível sugerir que compostos que protegem contra a carbonilação de proteínas podem ter significado clínico.

A SOD e a CAT desempenham um papel importante no sistema de defesa antioxidante, combatendo a produção de ROS e o estresse oxidativo [132].

Neste estudo, foi observado que o AlCl_3 administrado por 90 dias promoveu uma inibição das atividades de CAT e SOD no hipocampo e aumentou a atividade de SOD no córtex de camundongos adultos. Os efeitos ambíguos promovidos pelo AlCl_3 nas atividades das enzimas em diferentes regiões do cérebro são descritos na literatura, onde diferentes atividades são associadas ao tipo de protocolo experimental, através de diferentes condições, como a dose de Al, tempo de tratamento, espécie e idade dos animais [133,134,135,136,137,138]. Diante dessa observação, atribui-se que esse aumento da SOD é uma resposta adaptativa do córtex frontal envolvendo o aumento do estresse oxidativo, conforme relatado na literatura [139] e que esta mesma adaptação não ocorre no hipocampo. Apesar da razão pela qual o Al afetou diferencialmente as atividades enzimáticas entre o córtex e o hipocampo não ser ainda bem esclarecida, é notório que a crisina foi capaz de restabelecer as atividades tanto da SOD como da catalase nas regiões modificadas pelo AlCl_3 , corroborando com as evidências de que a crisina é um agente com potencial efeito neuroprotetor.

Al é um agente neurotóxico que leva a doenças neurodegenerativas, devido à aumento da produção de EROs e dos níveis de LPO [140]. O aumento de EROs e, conseqüentemente, do estresse celular agudo, pode resultar em morte celular por necrose [141]. O tratamento com AlCl_3 induziu necrose no córtex cerebral e no hipocampo, confirmados através dos testes histológicos onde observou-se que os

camundongos tratados com AlCl_3 mostraram alterações focais degenerativas e desorganização do tecido em comparação com os animais do grupo controle. Esses eventos morfológicos de agressão celular foram evitados pelo tratamento com crisina, confirmando as propriedades neuroprotetoras do composto.

Neurônios em áreas específicas do cérebro, incluindo córtex cerebral e hipocampo, são conhecidos por desempenhar um papel importante nos processos de aprendizagem e memória [141,142]. Os resultados histológicos mostraram que o AlCl_3 induziu alterações focais e degenerativas juntamente com o aumento do número de células necróticas, ocasionando a deficiência de memória e aprendizagem observada nos camundongos. Essa evidência corrobora que a metodologia utilizada neste estudo foi bem conduzida, em conformidade com a literatura e, portanto, assegurando a confiabilidade dos dados obtidos [143].

Em particular, todas as doses (10, 30 e 100 mg/kg) utilizadas de crisina, promoveram efeitos antioxidantes e neuroprotetores em ambas as regiões do cérebro. No entanto, a dose de 10 mg/kg de crisina, exibiu o mesmo potencial antioxidante e neuroprotetor a nível de SNC, uma vez que não foram encontradas diferenças entre as doses de crisina utilizadas. Essa evidência sugere que os processos de cruzamento da BHE podem se tornar saturados, limitando o aumento dos níveis de crisina no cérebro. Após a administração oral em camundongos, a crisina é altamente biotransformada pelo fígado, formando os metabólitos conjugados crisina-7-sulfato e crisina-7-glicuronídeo [144]. Apesar de esses conjugados aparecerem em concentrações mais altas na circulação do que a crisina, eles provavelmente não contribuem para os efeitos a nível de SNC, pois ambos não cruzam a BHE conforme previsto em estudos *in silico* [145,146]. Essas evidências, portanto, apóiam que a crisina possui uma predominante ação no cérebro. É provável que o aumento da dose de crisina também aumente seus metabólitos que limitam a disponibilidade de crisina na circulação que pode atravessar a BHE, explicando os mesmos efeitos neuroprotetores registrados entre 10 e 100 mg/kg.

Sendo assim, o presente estudo mostrou que o AlCl_3 leva ao comprometimento cognitivo de camundongos após 90 dias de tratamento, devido ao aumento da atividade das ChEs no hipocampo, local em que desempenham um importante papel na aprendizagem e na memória de longo prazo. Esse prejuízo cognitivo também pode

ser atribuído ao desequilíbrio oxidativo observado em ambos córtex cerebral e hipocampo. Por fim, de forma bem evidenciada, o tratamento com a crisina protegeu contra essas disfunções neurotóxicas, normalizando as atividades das colinesterases e dos marcadores de estresse oxidativo (LPO, PC, CAT e SOD) e, assim sendo, diminuindo a morte celular e o comprometimento cognitivo dos camundongos.

6. Conclusão

Neste estudo foi demonstrado que tratamento com crisina atenuou o comprometimento cognitivo induzido pela exposição crônica ao AlCl_3 , restaurando o sistema colinérgico cerebral e o desequilíbrio oxidativo. Esses achados reforçam os benefícios à saúde da crisina, indicando-a como uma possível nova estratégia para atuar contra as doenças neurológicas e neurodegenerativas, e apoiando também ao seu potencial uso como suplemento alimentar para a manutenção de um cérebro saudável.

7. Referências bibliográficas

- [1] Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 10, 1-269. <https://doi.org/10.1080/10937400701597766>.
- [2] Chappard, D., 2016. Effects of aluminum on cells and tissues. *Morphology*. 100, 49–50. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.04.001>.
- [3] Gupta, Y.K., Meenakshi, G., Peshin, S.S. 2019. Aluminium utensils: Is it a concern?. *The National Medical Journal of India*. 50, 8–15. <https://doi.org/10.2307/2948853>.
- [4] Al osma, M., Yang, F., Massey, I.Y. 2019. Exposure routes and health effects of heavy metals on children. *Biometals*. 32, 563–573. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00193-5>.
- [5] Kawahara, M., Kato-Negishi, M. 2011. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011, 1–17. <https://doi.org/10.4061/2011/276393>.
- [6] Klotz, K., Weistenhöfer, W., Neff, F., Hartwig, A., Van T., Christoph, D., 2017. The health effects of aluminum exposure. *Deutsches Arzteblatt International medicine*. 114, 653–659. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0653>.
- [7] Schiffman, R.B., Luevano, D.R., 2018. Aluminum toxicity. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 142, 742–746. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0049-OA>.
- [8] Exley, C., 2013. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 15, 1785–1970. <https://doi.org/10.1039/c3em00374d>.

- [9] Borowska, S., Brzóska, M.M., 2015. Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology*. 35(6), 551-72. <https://doi.org/10.1002/jat.3129>.
- [10] Wang, L., 2018. Entry and deposit of aluminum in the brain. *Neurotoxicity of Aluminum, Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1091, 39–51. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1370-7_3.
- [11] Igbokwe, I.O., Igwenagu, E., Igbokwe, N.A., 2020. Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary Toxicology*. 12, 45–70. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0007>.
- [12] Fu, Z., Xi, S., 2020. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>.
- [13] Kawahara, M., Kato-Negishi, M., Hosoda, R., Imamura, L., Tsuda, M., Kuroda, Y., 2003. Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons from aluminum maltolate neurotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 97, 124–131. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00255-1).
- [14] Guo, G.W., Liang, Y.X., 2001. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain Research*. 888, 221–226. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03057-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03057-2).
- [15] Chappard, D., Bizot, P., Mabilieu, G., Hubert, L., 2016. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al_3^+ deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie*. 100, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.001>.
- [16] Willhite, C.C., Karyakina, N.A., Yokel, R.A., Yenugadhati, N., Wisniewski, T.M., Arnold, I.M.F., Momoli, F., Krewski, D., 2014. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and

nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Critical Reviews in Toxicology*. 44, 1–80. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.934439>.

[17] Darbre, P.D., 2005. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 99, 1912–1919. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.06.001>.

[18] Kongerud, J., Soyseth, V., 2014. Respiratory disorders in aluminum smelter workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 56, 60–70. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000105>.

[19] Shaw, C.A., Tomljenovic, L., 2013. Aluminum in the central nervous system (CNS): Toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunologic Research*. 56, 304–316. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8403-1>.

[20] Mold, M., Umar, D., King, A., Exley, C., 2018. Aluminium in brain tissue in autism. *Immunologic Research*. 46, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.11.012>.

[21] McLachlan, D.R.C., Bergeron, C., Alexandrov, P.N., Walsh, W.J., Lukiw, W.J., 2019. Aluminum in neurological and neurodegenerative disease. *Molecular Neurobiology*. 56, 1531–1538. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1441-x>.

[22] Bjorklund, G., Stejskal, V., Urbina, M.A., Dadar, M., Mutter, J., 2018. Metals and Parkinson's disease: Mechanisms and biochemical processes. *Current Medicinal Chemistry*. 25, 2198–2214. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171129124616>.

[23] Wang, L., 2018. Entry and deposit of aluminum in the brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1091, 39–51. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1370-7_3.

[24] WHO (World Health Organization International Programme on Chemical safety), 2004. Environmental health criteria 194, Aluminium. World Health organization, Geneva pp. 282.

[25] Armstrong, A.R., 2010. Risk factors for Alzheimer's disease. *Brain and Nerve*. 62, 679–690. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>.

[26] Kawahara, M., 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 8, 171–182. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-8210>.

[27] Abd-Elghaffar, S.K.H., El-Sokkary, G.H., Sharkawy, A.A., 2007. Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin. *Neuroendocrinology Letters*. 26, 225–240. <https://doi.org/10.3233/-2005-82102698>.

[28] Castorina, A., Tiralongo, A., Giunta, S., Carnazza, M.L., Scapagnini, G., D'Agata, V., 2010. Early effects of aluminum chloride on beta-secretase mRNA expression in a neuronal model of β -amyloid toxicity. *Cell Biology and Toxicology*. 26, 367–377. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9149-3>.

[29] Kawahara, M., Kato, M., Kuroda, Y., 2001. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of β -amyloid protein. *Brain Research Bulletin*. 55, 211–217. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00475-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00475-0).

[30] Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S., 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 76, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>.

[31] Ferreira-Vieira, T., Guimaraes, I., Silva, F., Ribeiro, F., 2016. Alzheimer's Disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*. 14, 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>.

- [32] Bielarczyk, H., Tomaszewicz, M., Szutowicz, A., 1998. Effect of Aluminum on Acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*. 70, 1175-1181. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70031175.x>.
- [33] Zatta, P., Ibn-Lkhayat-Idrissi, M., Zambenedetti, P., Kilyen, M., Kiss, T., 2002. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. 59, 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(02\)00836-5](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(02)00836-5).
- [34] Hofstetter, J.R., Vincent, I., Bugiani, O., Ghetti, B., Richter, J.A., 1987. Aluminum-induced decreases in choline acetyltransferase, tyrosine hydroxylase, and glutamate decarboxylase in selected regions of rabbit brain. *Neurochemical Pathology*. 6, 177–193. <https://doi.org/10.1007/BF02834199>.
- [35] Silva, V.S., Cordeiro, J.M., Matos, M.J., Oliveira, C.R., Gonçalves, P.P., 2002. Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol. *Neuroscience Research*. 44, 181–193. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00128-1).
- [36] Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I., 2002. Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of poly-phosphoinositide hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 408, 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00557-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00557-X).
- [37] Oteiza, P.I., 1994. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 308, 374–379. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1053>.
- [38] Kaneko, N., Sugioka, T., Sakurai, H., 2007. Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress.

Journal of Inorganic Biochemistry. 101, 967–975.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.03.005>.

[39] Walton, J.R., 2013. Aluminum's involvement in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 35, 7–43. <https://doi.org/10.3233/JAD-121909>.

[40] Lemire, J., Mailloux, R., Puiseux-Dao, S., Appanna, V.D., 2009. Aluminum-induced defective mitochondrial metabolism perturbs cytoskeletal dynamics in human astrocytoma cells. *Journal of Neuroscience Research*. 87, 1474-1483. <https://doi.org/10.1002/jnr.21965>.

[41] García, T., Esparza, J.L., Giralt, M., Romeu, M., Domingo, J.L., Gómez, M., 2010. Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of A β PP transgenic mice after chronic exposure to aluminum. *Biological Trace Element Research*. 135, 220-232. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8490-y>.

[42] Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 111, 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.

[43] Su, H., Wan, C., Song, A., Qiu, Y., Xiong, W., Zhang, C., 2019. Oxidative stress and renal fibrosis: mechanisms and therapies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1165, 585-604. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_29.

[44] Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

[45] Aditya, D., Roberto, M., Kezhong, Z., 2015. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. *Stress Responses: Methods and Protocols*. 1292, 1-243. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2522-3>.

- [46] Yang, B., Chen, Y., Shi, J., 2019. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *chemical reviews*. 119, 4881-4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>.
- [47] Filomeni, G., De Zio, D., Cecconi, F., 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*. 22, 377-388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>.
- [48] Wickens, A.P., 2001. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*. 128, 379-391. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00313-9).
- [49] Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krause, K.H., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*. 142, 1-14. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- [50] Kudryavtseva, A.V., Krasnov, G.S., Dimitriev, A.A., Alekseev, B.Y., Kardymon, O.L., et al., 2016. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 7, 44879-44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>.
- [51] Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*. 194, 7-15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>.
- [52] Liochev, S.I., 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 60, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>.
- [53] Lambert, A.J., and Brand, M.D., 2013. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Mitochondrial DNA, Methods and Protocols*. 554, 436-438. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00958-X>.
- [54] Moldogazieva, N.T., Lutsenko, S.V., Terentiev, A.A., 2018. Reactive oxygen and nitrogen species-induced protein modifications: Implication in carcinogenesis and

anticancer therapy. *Cancer Research*. 78, 6040-6047. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0980>.

[55] Adams, L., Franco, M.C., Estevez, A.G., 2015. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*. 240, 711-717. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>.

[56] Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S., 2019. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 24, 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.

[57] Klaunig, J.E., 2019. Oxidative stress and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 24, 4771-4778. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>.

[58] Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T.J., Mikolajczyk, T.P., 2019. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 70, 809-824. <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>.

[59] Senoner, T., Dichtl, W., 2019. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. *Nutrients*. 11, 1-25. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>.

[60] Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P., 2018. Nutrients and oxidative stress: friend or foe?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018, 1-24. <https://doi.org/10.1155/2018/9719584>.

[61] Snezhkina, A.V., Kudryavtseva, A.V., Kardymon, O.L., Savvateeva, M.V., Melnikova, N.V., et al., 2020. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>.

- [62] Goffi, V., Magri, A., Botondi, R., Petriccione, M., 2020. Response of antioxidant system to postharvest ozone treatment in 'Soreli' kiwifruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100, 961-968. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10055>.
- [63] Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P., 2003. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53, 1-9. <https://doi.org/10.1002/S110-S118>.
- [64] Barbosa, K., Costa, N., De Cássia G., Paula, S., Minim, V., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 23, 629-643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- [65] Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- [66] Schneider, C.D., and Oliveira, A.R., 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10, 308-313. <https://doi.org/10.1590/s1517-86922004000400008>.
- [67] Ismaeel, A., Holmes, M., Papoutsis, E., Panton, L., Koutakis, P., 2019. Resistance training, antioxidant status, and antioxidant supplementation. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2018, 1-29. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0339>.
- [68] Baek, J., and Lee M.G., 2015. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox report*. 0, 1-6. <https://doi.org/10.1179/1351000215Y.0000000015>.
- [69] Brainina, K., Tarasov, A., Khamzina, E., Kazakov, Y., Stozhko, N., 2019. Disposable potentiometric sensory system for skin antioxidant activity evaluation. *Sensors (Switzerland)*. 19, 1-10. <https://doi.org/10.3390/s19112586>.

- [70] DaFelice, S.L., 1989. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science and Technology*. 6, 59-61. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88944-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88944-X).
- [71] Diaz, L.D., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., 2020. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60, 1738-1746. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1592107>.
- [72] Santini, A.M., Cammarata, G., Capone, A., Ianaro, G.C., Tenore, L., Pani, E. Novellino, E., 2018. Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 84, 659–72. <https://doi.org/10.1111/bcp.13496>.
- [73] Santini, A., Novellino, E., 2018. Nutraceuticals: Shedding light on the grey area between pharmaceuticals and food. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 11, 545–7. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1464911>.
- [74] Heal, N., Eassa, H., Amer, A., Eltokhy, M., Edafiogho, I., Nounou, M., 2019. Nutraceuticals' novel formulations: The good, the bad, the unknown and patents involved. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 13, 105-156. <https://doi.org/10.2174/1872211313666190503112040>.
- [75] Ohama, H., Ikeda, H., Moryama, H., 2006. Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*. 221, 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.015>.
- [76] da Costa, J.P., 2017. A current look at nutraceuticals – key concepts and future prospects. *Trends in Food Science and Technology*. 62, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.010>.

- [77] Orlando, J.M., 2018. Behavioral nutraceuticals and diets. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 48, 473-495. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.12.012>.
- [78] Tramontin, N., Luciano, T., Marques, S., Souza, C., Muller A., 2020. Ginger and avocado as nutraceuticals for obesity and its comorbidities. *Phytotherapy Research*. 34, 1282-1290. <https://doi.org/10.1002/ptr.6619>.
- [79] Huang, X., Yang, Z., Xie, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Ma, J., 2019. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 117, 109-142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>.
- [80] Ghaffari, S., Roshanravan, N., 2020. The role of nutraceuticals in prevention and treatment of hypertension: An updated review of the literature. *Food Research International*. 128, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108749>.
- [81] Borghi, C., Cicero, A., 2017. Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 83, 163-171. <https://doi.org/10.1111/bcp.12902>.
- [82] Makkar, R., Behl, T., Bungau, S., Zengin, G., Mehta, V., et al., 2020. Nutraceuticals in neurological disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms21124424>.
- [83] Rones, M., Pedersen, K., Watt, J., 2018. Adverse effects of nutraceuticals and dietary supplements. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 58, 583-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052844>.
- [84] Loiacono, C., Palermi, S., Massa, B., Belviso, I., 2019. Tendinopathy: Pathophysiology, therapeutic options, and role of nutraceuticals. *A Narrative Literature*

Review. Medicina (Lithuania). 55, 447-459.
<https://doi.org/10.3390/medicina55080447>.

[85] Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I., Shariati, M.A., IqraYasmin, S., et al., 2019. Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. Life Sciences. 235, 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>.

[86] Mani, R., Natesan, V., 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. Phytochemistry. 145, 187-196.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>.

[87] Nabavi, S., Braidy, N., Habtemariam, S., Orhan, I., Daglia, M., Manayi, A., Gortzi, O., Nabavi, S., 2015. Neuroprotective effects of chrysin: from chemistry to medicine. Neurochemistry International. 90, 224-231.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.09.006>.

[88] German-Ponciano, L., Dutra C., Bruna P., Feitosa, L., Campos, Kimberly, S., et al., 2020. Chrysin, but not flavone backbone, decreases anxiety-like behavior in animal screens. Neurochemistry International. 140, 1-31.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104850>.

[89] Fazel, S., Braidy, N., Habtemariam, S., Erdogan, I., Daglia, M., et al., 2015. Chrysin, but not flavone backbone, decreases anxiety-like behavior in animal screens. Neurochemistry International. 140, 1-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104850>.

[90] Noh, K., Oh, D.G., Nepal, M.R., Jeong, K.S. Choi, Y., et al., 2016. Pharmacokinetic interaction of chrysin with caffeine in rats. Biomolecules and Therapeutics. 24, 446-452. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.197>.

[91] Silvester, A.J., Aseer, K.R., Yun, J.W., 2019. Dietary polyphenols and their roles in fat browning. Journal of Nutritional Biochemistry. 64, 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.028>.

- [92] Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Bafandeh, F., 2019. The cardiovascular protective effects of Chrysin: A narrative review on experimental researches. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 17, 17-27. <https://doi.org/10.2174/1871525717666190114145137>.
- [93] Anandhi, R., Annadurai, T., Anitha, T.S., Muralidharan, A.R., 2013. Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 69, 313-323. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0215-6>.
- [94] Farkhondeh, T., Samarghandian, S., Roshanravan, B., 2019. Impact of chrysin on the molecular mechanisms underlying diabetic complications. *Journal of Cellular Physiology*. 234, 17144-17158. <https://doi.org/10.1002/jcp.28488>.
- [95] Li, T.F., Ma, J., Han, X.W., Jia, Y.X., Yuan, H.F., 2019. Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Neurochemistry International*. 129, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104496>.
- [96] Angelopoulou, E., Pyrgelis, E.S., Piperi, C., 2020. Neuroprotective potential of chrysin in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and clinical implications. *Neurochemistry International*. 132, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104612>.
- [97] Krishnamoorthy, A., Sevanan, M., Mani, S., Balu, M., 2019. Chrysin restores MPTP induced neuroinflammation, oxidative stress and neurotrophic factors in an acute Parkinson's disease mouse model. *Neuroscience Letters*. 709, 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134382>.

- [98] He, X., Wang, Y., Bi, M., Du, G., 2012. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *European Journal of Pharmacology*. 680, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.025>.
- [99] Oliveira, T.S., Thomaz, D.V., da Silva, H.F., Cerqueira, L.B., Garcia, L.F., Gil, H.P.V., Pontarolo, R., Campos, F.R., Costa, E.A., Santos, F.C.S., Gil, E.S., Ghedini, P.C., 2018. Neuroprotective Effect of Caryocar brasiliense Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/9842908>.
- [100] Thomaz, D.V., Peixoto, L.F., Oliveira, T.S., Fajemiroye, J.O., Neri, H.F.S., Xavier, C.H., Costa, E.A., Santos, F.C.A., Gil, E.S., Ghedini, P.C., 2018. Antioxidant and Neuroprotective Properties of Eugenia dysenterica leaves. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/3250908>.
- [101] Montgomery, K.C., 1956. Fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Valdosta State University*. 254–260. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>.
- [102] Boissier, J., Tardy, J., Diverres, J.C., 1960. Une nouvelle méthode simple pour explorer l'action «tranquillisante»: le test de la cheminée. *Med. Exp.* 3, 81–84. <https://doi.org/10.1159/000134913>.
- [103] Kameyama, T., Nabeshima, T., Kozawa, T., 1986. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method - Suitability for experimental amnesia models. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 16, 39–52. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(86\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0160-5402(86)90027-6).
- [104] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

- [105] Lane, M.R., Potkin, G.S., Enz, A., 2006. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Inter. Journal of Neuropsychopharmacology*. 9, 101–124. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005833>.
- [106] Pahanka, M., 2016. Electrochemical Biosensors based on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: A Review. *International Journal of Electrochemical Science*. 11, 7440 – 7452. <https://doi.org/10.20964/2016.09.16>.
- [107] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- [108] Tsikas, D., 2016. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*. 524, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>.
- [109] Rio, H.D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 15, 316-328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>.
- [110] Estévez, M., Padilla, P., Carvalho, L., Martin, L., Carrapiso, A., Delgado, J., 2019. Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins. *Redox Biology*. 26:(2019), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101277>.
- [111] Fedovora, M., Bollineli, R.C., Hoffmann, R., 2014. Protein Carbonylation as A Major Hallmark of Oxidative Damage: *Mass Spectrometry Reviews*. 33, 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.

- [112]** Colombo, G., et al., 2015. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 19750,1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>.
- [113]** Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, S., Shaltiel, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Enzymatic Methods of Analysis*. 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H).
- [114]** Miao, L., Clair, D.K.S., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 47, 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>.
- [115]** Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 247(10):3170-5. PMID: 4623845.
- [116]** Kirkman, N.R., Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 32(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>.
- [117]** Aebi, H., 1984. Catalase. *Enzyme Act Oxidoreductases*. 51, 674–684. <https://doi.org/10.1086/330448>.
- [118]** Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [119]** Albers, M.W., Gilmore, G.C., Kaye, J., Murphy, C., Wingfield, A., Bennett, D.A., Boxer, A.L., Buchman, A.S., et al., 2015. At the interface of sensory and motor dysfunctions and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 11, 70–98. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.514>.

- [120] Farhat, S.M., Mahboob, A., Iqbal, G., Ahmed, T. 2017. Aluminum-induced cholinergic deficits in different brain parts and its implications on sociability and cognitive functions in mouse. *Biological Trace Element Research*. 177, 115–121. [https://doi.org/ 10.1007/s12011-016-0856-3](https://doi.org/10.1007/s12011-016-0856-3).
- [121] Costa, M., Bernardi, J., Fiuza, T., Costa, L., Brandão, R., Pereira, M.E., 2016. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-Biological Interactions*. 253, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.026>.
- [122] Costa, M., Bernardi, J., Costa, L., Fiuza, T., Brandão, R., Ribeiro, M.F., Amaral, J.D., Rodrigues, C.M.P., Pereira, M.E., 2017. N-acetylcysteine treatment attenuates the cognitive impairment and synaptic plasticity loss induced by streptozotocin. *Chem. Biol. Interact.* 272, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.008>.
- [123] Stepanichev, M., Nedogreeva, O., Gulyaeva, N., 2017. Cholinergic degeneration in early stages of Alzheimer's disease: Loss of cholinergic phenotype or loss of cells? *Alzheimer's, Dementia & Cognitive Neurolog.* 2, 1–7. <https://doi.org/10.15761/ADCN.1000110>.
- [124] Macdonald, I.R., Maxwell, S.P., Reid, G.A, Cash, M.K., DeBay, D.R., Darvesh, S., 2017. Quantification of butyrylcholinesterase activity as a sensitive and specific biomarker of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 58, 491–505. [https://doi.org/ 10.3233/JAD-170164](https://doi.org/10.3233/JAD-170164).
- [125] Khan, H., Marya, S., Amin, M.A., Kamal, S., Patel, S., 2018. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 101, 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>.

- [126] Balkis, A., Tran, K., Lee, Y.Z., Ng, K., 2015. Screening flavonoids for inhibition of acetylcholinesterase identified baicalein as the most potent inhibitor. *The Journal of Agricultural Science*. 7, 26–35. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n9p26>.
- [127] Taslimi, P., Caglayan, C., Gulcin, I., 2017. The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 31, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jbt.21995>.
- [128] Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Azimi-nezhad, M., Mohammad, A., Shahri, P., 2019. Antidotal or protective effects of honey and chrysin, its major polyphenols, against natural and chemical toxicities. *Acta Biomedicine*. 90, 2–18. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i4.7534>.
- [129] Nabavi, F.S., Braidy, N., Habtemariam, S., Erdogan, I., Daglia, M., Manayi, A., Gortzi, O., Nabavi, S.M., 2015. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. *Neurochemistry International*. 90, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.09.006>.
- [130] Günther, G., Berríos, E., Pizarro, N., Valdés, K., Montero, G., Arriagada, F., Morales, J., 2015. Flavonoids in microheterogeneous media, relationship between their relative location and their reactivity towards singlet oxygen. *Plus One*. 10: e0129749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129749>.
- [131] Fedorova, M., Bollineni, R.C., Hffmann, R., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 33, 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.
- [132] Birden, E., Sahiner, U.M., Sachesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO journal*. 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

- [133] Jelenković, A., Abedi, F., Jovanović, M.D., Stevanović, I., Petronijević, N., Bokonjić, D., Zivković, J., Igić, R., 2014. Influence of the green tea leaf extract on neurotoxicity of aluminium chloride in rats. *Phytotherapy research*. 28, 82–87. <https://doi.org/10.1002/ptr.4962>.
- [134] Tehrani, S.H., Movahedi, A.A.M., 2018. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>.
- [135] Atienzar, F., Desor, D., Burnel, D., Keller, J., Lehr L., Vasseur, P., 1998. Effect of aluminum on superoxide dismutase activity in the adult rat brain. *Biological Trace Element Research*. 62, 20–32. <https://doi.org/10.1007/s12267-019-0019-9>.
- [136] Chia-Yi, Y., Yih-Jing, L., Guoo-Shyng, W., 2012. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science*. 19:51, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-51>.
- [137] Benyettou, I., Kharoubi, o., Hallal, N., Benyettou, A., Tair, K., Belmokhtar, M., Aoues, A., Ozaslan, M., 2017. Aluminium-induced behavioral changes and oxidative stress indeveloping rat brain and the possible ameliorating role of omega-6/Omega-3 ratio. *Journal of Biological Sciences*. 17:3, 106–117. <https://doi.org/10.3923/jbs.2017.106.117>.
- [138] Sadauskiene, L., Liekis, A., Staneviciene, I., Naginiene, R., Ivanov, L., 2020. Effects of long-term supplementation with aluminum or selenium on the activities of antioxidant enzymes in mouse brain and liver. *Catalysts*. 10:585, 1–11. <https://doi.org/10.3390/catal10050585>.
- [139] Navarro, A., Boveris, A., Báñez, M., Sánchez-Pino, M., Gómez, C., Muntané, G., Ferrer, I., 2009. Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Rad. Biology & Medicine*. 46, 1574–1580. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.007>.

- [140] Farkhondeh, T., Abedi, F., Samarghandian, S., 2019. Chrysin attenuates inflammatory and metabolic disorder indices in aged male rat. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 109, 1120–1125. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.059>.
- [141] Feng, X., Qin, H., Shi, Q., Zhang, Y., Zhou, F., Wu, H., Ding, S., Niu, Z., Shen, P., 2014. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPAR γ . *Biochemical Pharmacology*. 89, 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.03.016>.
- [142] Yamawaki, N., Corcoran, K.A., Guedea, A.L., Shepherd, G.M.G., Radulovic. 2019. Differential contributions of glutamatergic hippocampal→retrosplenial cortical projections to the formation and persistence of context memories. *Cerebral Cortex*. 29, 2728–2736. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy142>.
- [143] Matthews, B.R., 2015. Memory dysfunction. *Behavioral Neurology and Neuropsychology*. 21, 613–626. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000466656.59413.29>.
- [144] Mohos, V., Fliszár-Nyúl, E., Ungvári, O., Bakos, É., Kuffa, K., Bencsik, T., Zsidó, B.Z., Hetényi, C., Telbisz, Á., Özvegy-Laczka, C., Poór, M., 2020. Effects of chrysin and its major conjugated metabolites chrysin-7-sulfate and chrysin-7-glucuronide on cytochrome p450 enzymes and on OATP, P-gp, BCRP, and MRP2 transporters. *Drug Metabolism & Disposition*. 48(10), 1064-1073. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000085>.
- [145] Daiana, A., and Zoete, V., 2016. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *Chemistry Europe*. 11, 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>. Disponível em: <http://www.swissadme.ch/>.
- [146] Daiana, A., Michielin, O., Zoete, V., 2016. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of

small molecules. Scientific reports. 7:42717, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
Disponível em: <http://www.swissadme.ch/>.

8. Anexo



Protective effects of chrysin against the neurotoxicity induced by aluminium: *In vitro* and *in vivo* studies

Hericles Mesquita Campos^a, Michael da Costa^a, Lorrane Kelle da Silva Moreira^a,
 Hiasmin Franciely da Silva Neri^a, Cinthia Rio Branco da Silva^b, Letizia Puccoli^c,
 Fernanda Cristina Alcantara dos Santos^b, Elson Alves Costa^a, Andrea Tarozzi^c,
 Paulo César Ghedini^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^c Department for Life Quality Studies, University of Bologna, Rimini, Italy

ARTICLE INFO

Handling Editor: K. Wallace

Keywords:

Aluminium
 Neurotoxicity
 Oxidative stress
 Antioxidant
 Chrysin

ABSTRACT

Chronic exposure to aluminium (Al) can contribute to the progression of several neurological and neurodegenerative diseases. Al is a metal that promotes oxidative damage leading to neuronal death in different brain regions with behavior, cognition, and memory deficits. Chrysin is a flavonoid found mainly in honey, passion fruit, and propolis with antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties. In this study, we used an integrated approach of *in vitro* and *in vivo* studies to evaluate the antioxidant and neuroprotective effects of chrysin against the neurotoxicity elicited by aluminium chloride (AlCl₃). In *in vitro* studies, chrysin (5 μM) showed the ability to counteract the early oxidative stress elicited by tert-butyl hydroperoxide, an oxidant that mimics the lipid peroxidation and Fenton reaction in presence of AlCl₃ as well as the late necrotic death triggered by AlCl₃ in neuronal SH-SY5Y cells. In *in vivo* studies in a mouse model of neurotoxicity induced by chronic exposure to AlCl₃ (100 mg/kg/day) for ninety days then corroborated the antioxidant and neuroprotective effect of chrysin (10, 30, and 100 mg/kg/day) using the oral route. In particular, chrysin reduced the cognitive impairment induced by AlCl₃ as well as normalized the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in the hippocampus. In parallel, chrysin counteracted the oxidative damage, in terms of lipid peroxidation, protein carbonylation, catalase, and superoxide dismutase impairment, in the brain cortex and hippocampus. Lastly, necrotic cells frequency in the same brain regions was also decreased by chrysin. These results highlight the ability of chrysin to prevent the neurotoxic effects associated with chronic exposure to Al and suggest its potential use as a food supplement for brain health.

* Corresponding author at: Biochemical and Molecular Pharmacology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Cep 74690-900, Goiânia, GO, Brazil.

E-mail addresses: pcghedini@ufg.br, pcghedini@gmail.com (P.C. Ghedini).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153033>

Received 17 June 2021; Received in revised form 4 October 2021; Accepted 9 November 2021

Available online 10 November 2021

0300-483X/© 2021 Published by Elsevier B.V.