

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA EM MODELOS DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS**

TESE DE DOUTORADO

Lucian Del Fabbro

Uruguaiana, RS, Brasil.

2019

EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA EM MODELOS DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

por

Lucian Del Fabbro

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do
Grau de Doutor em Bioquímica, pelo programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian
Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguaiana, RS, Brasil.

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

D331e Del Fabbro, Lucian

Efeito do flavonoide crisina em modelos de doenças
neurodegenerativas / Lucian Del Fabbro.

81 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2019.

"Orientação: Ana Flávia Furian Cristiano Ricardo Jesse".

1. Neurodegeneração. 2. Neuroproteção. 3. Neuroinflamação.
4. Nutracêutico. I. Título.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA EM MODELOS DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS**

Elaborada por

Lucian Del Fabbro

Como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian (presidente, orientadora)

Prof.^a Dr.^a Marina Prigol (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra (UNIPAMPA)

Dr. Carlos Borges Filho (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes (UFSM)

Uruguaiana, RS, Brasil.

2019

DEDICO

**Ao meu orientador, amigo e fonte de inspiração, professor
Cristiano Ricardo Jesse, “Mestre”, por me orientar,
guiar e aconselhar nos mais distintos momentos.
Espero poder um dia passar adiante um mínimo
de todo conhecimento que tu me transmitiste.
Me sinto eternamente honrado e agraciado por Deus,
pela oportunidade de ter trabalhado ao teu lado.**

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente a minha mãe Marli Teresinha Del Fabbro, meu pai Almiro Del Fabbro, minha avó Carmelina M. Del Fabbro e minha tia Marlene Del Fabbro por toda força e segurança que sempre me transmitiram, seus ensinamentos serão eternos.

Ao meu orientador prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, por toda força, confiança e ensinamentos, espero muito conseguir continuar seguindo o caminho o qual o senhor me mostrou ser possível trilhar.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian, pela confiança, pela recepção como seu orientado (novamente). Sou muito grato e me sinto muito honrado pela oportunidade de ter trabalhado ao seu lado, tenho uma enorme admiração pela senhora.

Ao prof. Mauro S. Oliveira, pela oportunidade de estar acompanhando o seu trabalho, pela recepção no laboratório, pela ajuda na conclusão dos artigos e pelas conversas e conselhos.

Aos meus amigos/colegas de laboratório e pós-graduação os quais me acompanharam desde a graduação de forma direta ou indireta Marcelo Gomes de Gomes, André Goes, Carlos Borges, Leandro Cattelan e Silvana Boeira, pela amizade em toda essa caminhada. Cada um de vocês tem sua participação especial em diferentes momentos. A todos os momentos os quais pareciam ser unicamente de descontração, mas que hoje vemos ter sido de construção de caráter. Aos novos colegas os quais tive a grata oportunidade de conhecer em Santa Maria.

Aos amigos que me acompanham desde os tempos de escola, de futebol com os pés descalços e que estiveram/estão ao meu lado, obrigado a todos vocês são mais que amigos, são verdadeiros irmãos!

Aos membros da banca examinadora, professores doutores Marina Prigol, Gustavo Petri Guerra, Luiz Fernando Freire Royes e ao Dr. Carlos Borges Filho pela disponibilidade de participar e contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal do Pampa, por toda a oportunidade concedida, em especial ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade de cursar o doutorado. A todos os professores e funcionários que fizeram parte desta jornada. À CAPES, que garantiu o sustento financeiro necessário à realização deste projeto de doutorado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que esta jornada na pós-graduação pudesse ser concluída.

EPIGRAFE

“O conhecimento serve para encantar as pessoas. Não para humilhá-las.”

(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA EM MODELOS DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Autor: Lucian Del Fabbro

Orientadora: Ana Flávia Furian

Coorientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e data da defesa: Itaqui-RS, 13 de julho de 2019.

As doenças neurodegenerativas são patologias com grandes impactos sociais e econômicos. Os distúrbios cerebrais são condições patológicas os quais a cirurgia corretiva não pode ser amplamente utilizada, devido a isso os tratamentos são baseados em medicamentos que apenas aliviam os sintomas. Vários estudos observacionais e epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em flavonoides melhora a função cognitiva e previne distúrbios neurodegenerativos em humanos. A crisina faz parte da classe flavona dos flavonoides e pode ser encontrada naturalmente no mel, própolis e várias espécies de plantas como a *Passiflora coerulea*. Em geral, a crisina exibe várias atividades biológicas e efeitos farmacológicos, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais e neuroprotetora. Neste contexto a doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo que afeta pessoas idosas em todo o mundo. A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela progressiva degeneração do sistema nigrostriatal e perda substancial de neurônios da substância negra parte compacta (SNc), além da depleção de dopamina (DA). A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante, que resulta em distúrbios neurodegenerativos no sistema nervoso central (SNC). A EM é considerada uma das mais intrigantes doenças neurológicas em virtude de seu caráter autoimune, crônico, e frequentemente acomete adultos jovens. Neste trabalho o modelo de DP utilizado foi o da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o qual tem sido usado desde o final da década de 70. A neurotoxina hidroxilada análoga da DA, quando administrada diretamente no corpo estriado de animais destrói seletivamente os neurônios nigrostriatais dopaminérgicos. Neste estudo nós demonstramos um efeito protetor da crisina na dose de 10 mg/kg (intra gástrica – i.g) contra alterações comportamentais e cognitivas, aumento dos marcadores enzimáticos e não enzimáticos de estresse oxidativo e da neuroinflamação. Além disso, a crisina protegeu contra redução nos níveis de DA e seus metabólitos. Experimentalmente o modelo animal mais usado para o estudo da EM é o modelo denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) um modelo animal de doença do SNC, o qual é induzido por imunização com antígenos derivados de mielina, usada em laboratório para a investigação da EM por se assemelhar a essa condição em diversos aspectos. Neste modelo a crisina na dose de 20 mg/kg (i.g) conseguiu reduzir a perda de peso causado pelo modelo EAE bem como diminuir os sinais clínicos do modelo. A crisina inibiu a atividade da histona deacetilase (HDCA) bem como da glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), reduziu os níveis das citocinas pró inflamatórias, além de regular as histonas acetiltransferases 3 e 4 (HAT3,

HAT4). O presente trabalho demonstrou o efeito protetor da crisina frente a dois modelos de doenças neurodegenerativas, expondo a crisina como um importante alvo para mais estudos. Espera-se que futuramente a crisina venha a ser um auxiliar no tratamento à EM e a DP.

Palavras-chave: Neurodegeneração, neuroproteção, neuroinflamação, nutracêutico

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Program of Post-Graduation in Biochemistry

Federal University of Pampa

**EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA EM MODELOS DE DOENÇAS
NEURODEGENERATIVAS**

Author: Lucian Del Fabbro

Advisor: Ana Flávia Furian

Co-advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Place and Date of defense: Itaqui-RS, July 13, 2019.

Neurodegenerative diseases are in particular pathologies with major social and economic impacts. Brain disorders are pathological conditions in which corrective surgery cannot be widely used, because of this, the treatments are based on medications that only relieve the symptoms. Several observational and epidemiological studies suggest that a diet rich in flavonoids improves cognitive function and prevents neurodegenerative disorders in humans. Chrysin is part of the flavone class of flavonoids and can be found naturally in honey, propolis and various plant species such as *Passiflora coerulea*. Chrysin generally exhibits various biological activities and pharmacological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antiviral and neuroprotective activities. In this context, Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder commonly affecting elderly people worldwide. The PD is a neurodegenerative disorder characterized by progressive degeneration of the nigrostriatal dopaminergic pathway with substantial loss of substantia nigra pars compacta (SNpc) neurons and depletion of dopamine (DA). Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory demyelinating neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). The MS is considered one of the most intriguing neurological diseases by virtue of its autoimmune, chronic character, frequency and tendency to approach young adults. In this study, the PD model used was the 6-Hydroxydopamine (6-OHDA), which has been used since the late 70s, hydroxylated DA analogue neurotoxin, when administered directly to the striatum of animals selectively destroys nigrostriatal dopaminergic neurons. We found a protective effect of chrysin at dose 10 mg/kg (intra gastric - i.g) on behavioral and cognitive alterations, increased enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress and neuroinflammation. In addition, chrysin protected against changes in striatal dopamine (DA), 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) levels. Experimentally the most commonly used animal model for the study of MS is the model denominated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of CNS disease, which is induced by immunization with myelin-derived antigens, used in the laboratory for the investigation of MS because it resembles this condition in several aspects. In this model chrysin at dose 20 mg/kg (i.g) reduced weight loss and attenuated clinical signs by model. Moreover, chrysin blunted the EAE-induced increase in histone deacetylase (HDCA) activity, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) levels and proinflammatory cytokine levels as well as in the EAE-induced decrease in histone acetyltransferases 3 and 4 (HAT3, HAT4). The current work demonstrated the

protective effect of chrysin against two models of neurodegenerative diseases, exposing chrysin as an important target for further studies. Expected that in the future the chrysin become a combat aid the MS and PD.

Keywords: Neurodegeneration, neuroprotection, neuroinflammation, nutraceutical

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	1
Figura 1: Estrutura química geral de um flavonoide	2
Figura 2: Estrutura química da crisina.....	3
Figura 3: Produção reduzida de dopamina a partir de neurônios dopaminérgicos da SNc.....	10
Figura 4: Comparação da degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNc	10
Figura 5: Formação de agregados de α Sinucleína como corpos de Lewy	11
Figura 6: Ciclo vicioso na neuroinflamação.....	11
Figura 7: 6-OHDA estruturalmente análoga a dopamina.....	13
Figura 8: Predisposição da EM por país em 2013	14
Figura 9: Porcentagem dos sintomas na EM	15
Figura 10: Placas de desmielinização.....	17
Figura 11: Processo de atividades das células T CD4+.....	17
Figura 12: Tipos de EM no diagnóstico	19
CONCLUSÃO	42
Figura 13: Mecanismo de ação da crisina no modelo de DP.....	42
Figura 14: Mecanismo de ação da crisina no modelo de EM.....	42
Artigo 1	23
Figure 1: Overview of study design.....	25
Figure 2: Effect of chrysin (10 mg/kg, i.g.) and/or 6-OHDA on (A) distance traveled in open field, (B) early and (C) late memory in passive avoidance test and (D) contralateral rotation test in mice (n = 5 mice/group). It is also shown the effect of chrysin and 6-OHDA on Barnes maze test (n = 10 mice/group). (E) Time to target in trial days, (F) number of errors in trial days, (G) time to target in the 5th day, (H) number of errors in the 5th day, (I) time to target in the 12th day, (J) number of errors	

in the 12th day. * P < 0.05 when compared with Vehicle/Vehicle. # P < 0.05 when compared with 6-OHDA/Vehicle. 27

Figure 3: Effect of treatment chrysin and 6-OHDA on (A) NO_x, (B) GSH, (C) HNE and (D) RS levels (n = 5 mice/group) as well as (E) NADPH oxidase and (F) Na⁺, K⁺-ATPase activities (n = 5 mice/group). It is also shown the effect of chrysin and 6-OHDA on (G) Dopamine, (H) DOPAC, (I) HVA, (J) IL-β and (K) TNF-α levels (n = 4 mice/group). The values were analyzed by two-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison test and expressed as the mean ± SEM. * P < 0.05 when compared with Vehicle/Vehicle. # P < 0.05 when compared with 6-OHDA/Vehicle. 28

Artigo 2..... 30

Figure 1: Overview of study design..... 32

Figure 2: Effect of treatment chrysin and MOG35-55/CFA on the clinical scores (A), area under curve (AUC) and body weight changes (C) in mice in a model of EAE. (Values are means and S.E.M. (n=6). *P<0.05 when compared with naïve/vehicle; # P<0.05 when compared with EAE/vehicle (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test)..... 33

Figure 3: Effect of treatment chrysin and MOG35-55/CFA on the GSK3β levels in the SPLEEN (A), SC (B), HIP (C) and PFC (D) (Values are means and S.E.M. (n=6). *P<0.05 when compared with Naïve/vehicle; # P<0.05 when compared with EAE/vehicle (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test) 34

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO	1
Tabela 1: Drogas usadas no tratamento da doença de parkinson	11
Tabela 2: Modelos clássicos da EAE	21
Artigo 2	30
Table 1: Effect of treatment chrysin and EAE on HDAC, HAT 3 and HAT 4 activities in the in spleen, HIP, PFC and SC of mice.....	34
Table 2: Effect of treatment chrysin and EAE on pro-inflammatory cytokines levels in the spleen, HIP, PFC and SC of mice.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

DP, Doença de Parkinson;

SNC, Substância negra parte compacta;

DA, Dopamina;

EM, Esclerose Múltipla;

SNC, Sistema nervoso central;

6-OHDA, 6-hidroxidopamina;

NO_x, Óxido nítrico;

GSH, glutationa;

TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor- α*);

NADPH oxidase, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;

HVA, Ácido homovanílico (do inglês *homovanillic acid*);

EAE, Encefalomielite autoimune experimental;

HDCA, Histona deacetilase;

GSK-3 β , Glicogênio sintase kinase-3 β ;

HAT3, HAT4, Histonas deacetilases 3 e 4;

AD, Doença de Alzheimer (do inglês *alzheimer disease*);

DH, Doença de Huntington;

ELA, Esclerose Lateral Amiotrófica;

NAE, Neurite autoimune experimental;

3-NP, Ácido-3-nitropropiónico;

PG, Prostaglandina;

IL, Interleucina;

LB, Corpos de Lewy (do inglês *lewy bodies*);

DAT, Transportador de dopamina (do inglês *dopamine transporter*);

MAO, Monoaminas oxidases;

ROS, Espécies reativas ao oxigênio (do inglês *reactive oxygen specie*);

TFAM, Fator de transcrição A (do inglês *mitochondrial transcription fator*);

ABEM, Associação Brasileira de Esclerose Múltipla;

MSIF, Federação Internacional de Esclerose Múltipla (do inglês *Multiple Sclerosis International Federation*);

SUS, Sistema único de saúde;

APCs, Células apresentadoras de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*);

Th1, células T Helper 1

Th17, células T Helper 17

BHE, Barreira hemato encefálica;

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
EPÍGRAFE	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
APRESENTAÇÃO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Flavonoides	1
1.1.1. Flavonoides e doenças neurodegenerativas	2
1.2 Crisina	3
1.2.1 Propriedades bioativas da crisina	3
1.2.2 Efeito neuroprotetor	4
1.3 Doenças neurodegenerativas	4
1.3.1 Doenças neurodegenerativas e a neuroinflamação	5
1.3.2 Doenças neurodegenerativas e epigenética	6
1.3.3 Neuroinflamação, epigenética e a GSK-3β	6
1.3.4 Doença de Parkinson	7
1.3.4.1 Epidemiologia	7
1.3.4.2 Doença de Parkinson: Manifestações clínicas	8
1.3.4.3 Fisiopatologia	8
1.3.4.4 Tratamentos atuais	11
1.3.1.5 Modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	13

1.3.5 Esclerose Múltipla.....	14
1.3.5.1 Epidemiologia.....	14
1.3.5.2 Esclerose Múltipla: Manifestações clínicas	15
1.3.5.3 Fisiopatologia	16
1.3.5.4 Formas e diagnóstico	18
1.3.5.5 Tratamentos atuais	19
1.3.5.6 Modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos	21
2.2.1 No modelo da DP induzido por 6-OHDA	21
2.2.2 No modelo de EM da EAE	21
3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	22
3.1. Artigo 1: Crisina protege contra alterações comportamentais, cognitivas e neuroquímicas em um modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina.....	23
3.2. Artigo 2: Crisina suprime as respostas imunes e protege contra encefalomielite autoimune experimental em camundongos.....	30
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES.....	42
6. PERSPECTIVAS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS.....	58

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos já publicados e estão em sua íntegra na seção “PRODUÇÃO CIENTÍFICA”. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas encontram-se nos artigos e representam a íntegra deste estudo. Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontram-se no final desta tese e apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos neste trabalho. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente às citações que aparecem itens INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO desta tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavonoides

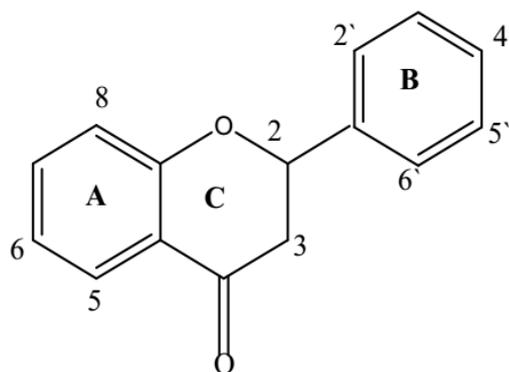
Flavonoides são compostos polifenólicos derivados de plantas e naturalmente presentes em frutas, grãos, legumes, raízes, cascas, flores, caules, chá e no vinho (Zeinali et al., 2017). Estão presentes na dieta humana rica em vegetais e frutas são considerados micronutrientes (Benavente-García et al., 1999). Estima-se que a ingestão de flavonoides na dieta humana varia entre 50 e 800 mg por dia ou mais, se os suplementos alimentares forem administrados e considerados (Pietta, 2000).

Já foram descobertos mais de 6.000 flavonoides os quais são divididos em 6 principais classes (Benavente-García et al., 1999). Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Os flavonoides são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA e a sua classificação é relativa ao nível de oxidação verificado em suas estruturas químicas (Lopes et al., 2003).

Nas plantas, os flavonoides fornecem proteção contra agentes externos (radiação UV, parasitas e vírus), regulam enzimas envolvidas no metabolismo celular e possuem propriedades antioxidantes (Manach et al., 2004). A estrutura química dos flavonoides (Fig. 1) está baseada no núcleo *flavilium*, o qual é composto de três anéis fenólicos. O primeiro anel é composto por um benzeno o qual é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel é um pirano heterocíclico, denominado de núcleo flavana (Peterson & Dwyer, 1998).

Os flavonoides são o maior grupo de metabólitos secundários de plantas, possuem diversas atividades biológicas benéficas para a saúde humana. Cada vez mais pesquisas sobre os flavonoides tem ocorrido devido sua ação em diversos mecanismos fisiológicos e um grande número de vias de sinalização as quais estão envolvidas em diversas doenças (Pietta, 2000).

Figura 1. Estrutura química geral dos flavonoides.



Fonte: Mani et al., 2018.

1.1.1. Flavonoides e doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são condições patológicas graves, as quais em muitos casos não possuem tratamentos eficazes como no caso da doença de Alzheimer (AD), a DP, a EM, a doença de Huntington (DH) e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Cheyuo et al., 2019). Os principais eventos moleculares e celulares que causam a neurodegeneração são o estresse oxidativo, a deposição de agregados protéicos, a neuroinflamação, o comprometimento da função mitocondrial e a apoptose (Hoglund & Salter, 2013). Os polifenóis podem ser considerados compostos com potencial neuroprotetor devido a sua capacidade de influenciar e modular estes processos celulares chaves implicados na neurodegeneração. Os flavonoides são particularmente a classe de polifenóis de maior interessante, o mais abundante subgrupo de polifenóis, amplamente presente na alimentação humana através de alimentos e bebidas (Solanki et ., 2015; Vauzour et al., 2008).

Estudos sobre a atividade antioxidante de flavonoides sugerem a relação da presença de hidroxilas na bioatividade destes compostos (Pushpavalli e al., 2010). Mais especificamente, a capacidade antioxidante de um flavonoide geralmente está relacionada com a sua hidroxilação (Pushpavalli e al., 2010). Além disso vários estudos sugerem um potencial papel neuroprotetor e antiinflamatório dos flavonoides (Spagnuolo et al., 2018). Nosso grupo já demonstrou que o flavonoide hesperidina apresenta efeito antidepressivo dependente da inibição da via L-arginina-NO (Donato et al., 2015), e também protege contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em camundongos idosos (Antunes et al., 2014). Outro flavonoide amplamente estudado em nosso laboratório é a crisina, que possui efeitos antidepressivos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e neuroprotetores (Borges et al., 2015, Souza et al., 2015, Goes et al., 2018, Del Fabbro et al., 2019).

1.2 Crisina

Neste contexto o flavonoide crisina (5,7-dihidroxiavona) ($C_{15}H_{10}O_4$) o qual possui uma estrutura química comum, consistindo de dois anéis fundidos, A e C, e um anel fenílico, B, ligado à segunda posição do anel C, compartilha a estrutura de uma flavona comum, com um grupo hidroxila adicional na quinta e na sétima posição do anel A (Fig. 2) (Mani & Natesan, 2018). A crisina pode estar presente em diversos tipos de méis, própolis, cogumelos e algumas plantas como a *Passiflora coerulea* (Borges et al., 2015; Ciftci et al., 2010; Kalogeropoulos et al., 2013). Em geral, a crisina exibe várias atividades biológicas e efeitos farmacológicos, incluindo atividades antioxidantes, antiinflamatórias, anticancerígenas, antivirais e neuroprotetoras. (Borges et al., 2015; Goes et al., 2018; Mani & Natesan, 2018; Souza et al., 2015).

Figura 2. Estrutura química da crisina.



Fonte: Nabavi et al., 2015.

1.2.1 Propriedades bioativas da crisina

Os efeitos benéficos da crisina e de outros flavonoides que ocorrem naturalmente dependem da sua biodisponibilidade e da sua concentração viável *in vivo*, a qual, por sua vez, depende da solubilidade destes compostos (Nabavi et al., 2015). Ao contrário de outros flavonoides, os benefícios terapêuticos da crisina são limitados devido sua baixa biodisponibilidade e absorção (Mani & Natesan, 2018). Walle et al., (2001) relataram que após uma administração única de 400 mg em sete voluntários saudáveis as concentrações de crisina permaneceram inalteradas, apresentando uma taxa de de ligação plasmática próxima a 99%. Entretanto a intensificação dos estudos com crisina iniciam após o relato de a crisina ser um potente inibidor da aromatase (Sanderson et al., 2004). Mais recentemente cresce o número de

evidências dos efeitos potenciais da crisina como agente farmacológico (Mani & Natesan, 2018). Além do potencial antioxidante (Pushpavalli et al., 2010), a crisina já tem sido apresentada como tendo efeitos anti-inflamatórios (Borges et al., 2015; Goes 2018), anti-depressivos (Borges et al., 2015), anti-hiperlipidêmicos (Zarzecki et al., 2014), anticâncer (Deldar et al., 2018), epigenéticos (Kanwal et al., 2016), neuroprotetores (Souza et al., 2015; Goes et al., 2018), e efeitos positivos no sistema reprodutor masculino de camundongos (Ciftci, et al., 2012; Del Fabbro et al., 2019).

1.2.2 Efeito neuroprotetor

Diversos estudos sugerem que a crisina pode ser um agente neuroprotetor em diferentes modelos de doenças em animais. De particular importância, Mercer et al. (2005) sugeriram que a crisina pode proteger os neurônios de insultos oxidativos e apoptóticos, assim como He et al. (2012) demonstraram que a crisina melhorou déficits cognitivos e danos cerebrais induzidos pela hipoperfusão cerebral crônica em ratos. Souza et al., 2015 demonstraram que o tratamento com crisina atenua o comprometimento da memória relacionada a idade em camundongos, bem como Mehri et al., (2014), demonstraram que a crisina suprimiu significativamente as alterações no índice comportamental em ratos wistar durante o tratamento com acrilamida (químico industrial tóxico, conhecido pela sua neurotoxicidade), Xiao et al., (2014) relataram que a crisina retardou o início e a gravidade dos sintomas clínicos da NAE (Neurite autoimune experimental, conhecido modelo animal da síndrome de Guillain barré) estes efeitos benéficos foram associados à redução da inflamação e da desmielinização dos nervos ciáticos. Aishwarya & Sumathi (2015) relataram que a crisina pode mitigar os danos oxidativos e a disfunção cognitiva associada à AD induzida por β -amilóide 25-35 em ratos wistar, recentemente Sumathi et al., (2016) relataram um efeito neuroprotetor da crisina contra a neurotoxicidade induzida pelo ácido-3-Nitropropiónico (3-NP) em ratos wistar, (o 3-NP é um inibidor irreversível do complexo mitocondrial-II que causa desregulação transcricional, falha bioenergética, agregação protéica e dano oxidativo semelhante à DH).

1.3 Doenças neurodegenerativas

A neurodegeneração é caracterizada por uma perda lenta e progressiva de células neuronais em regiões específicas do cérebro e da medula espinhal, representando a condição patológica de várias doenças neurodegenerativas. Outra característica comum das doenças neurodegenerativas, como a AD, EM, DP, DH e ELA, é a evidência de que estresse oxidativo

e nitrosativo contribuem para a morte das células neuronais e, assim, o desenvolvimento dessas doenças (Grosso et al., 2013).

A neuroinflamação também está intimamente relacionada à patogênese das doenças neurodegenerativas. As células da microglia no sistema nervoso central (SNC), são consideradas as principais células responsáveis pela neurotoxicidade mediada pela inflamação (Grosso et al., 2013), elas podem secretar citocinas pró-inflamatórias e mediadores neurotóxicos, como o fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandina (PG) E2, interleucinas NF- κ B, radicais livres como NO e O₂⁻, os quais contribuem para a lesões neuronais (Zheng et al., 2008). Enquanto a ativação microglial é um mecanismo de defesa natural contra lesões do SNC, a persistência da ativação é associada com a perda de neurônios na AD e DP (Elsisi et al., 2005).

1.3.1 Doenças neurodegenerativas e a neuroinflamação

A neuroinflamação, ou então, a ativação das células neuroimunes da micróglia e astrócitos em seu estado pró-inflamatório, tem sido implicada como um dos fatores patológicos em diversas doenças neurodegenerativas (Schain & Kreisl, 2017).

Sabe-se que as células imunológicas periféricas são consideradas incapazes de penetrar a barreira hematoencefálica. Em vez disso, as células gliais, micróglia e astrócitos, são os principais constituintes de um sistema neuroimune dedicado, e sua interação com o sistema imunológico periférico é pouco compreendida (Kanegawa et al., 2016). As células gliais fornecem funcionalidade pró e anti-inflamatória e participam de várias funções sob condições basais e durante as doenças, incluindo fagocitose, liberação de esteroides, redução de radicais livres e reparo celular (Kanegawa et al., 2016). As funções pró-inflamatórias, incluindo a liberação de citocinas e consequente formação de espécies reativas de oxigênio, podem danificar os neurônios saudáveis, causando disfunção sináptica, perda de sinapses e morte neuronal. Portanto, um desequilíbrio entre as funções pró-inflamatórias e reparatórias das células neuroimunes pode resultar em lesão do SNC. Embora os efeitos prejudiciais de tal desequilíbrio sejam reconhecidos na doença neuroimunológica clássica, como a esclerose múltipla, evidências crescentes sugerem que a ativação crônica de baixo nível das células da glia pode contribuir para alterações patológicas encontradas em muitas doenças neurodegenerativas (Schain & Kreisl, 2017).

1.3.2 Doenças neurodegenerativas e epigenética

A epigenética representa todas as mudanças hereditárias ou não hereditárias que não estão relacionadas às sequências modificadas de DNA e levam a uma expressão ou tradução alterada do genoma. Operando através de muitos mecanismos, incluindo metilação de DNA, modificações de histonas e interferência no RNA. Entre estas modificações a mais amplamente estudada é a acetilação e desacetilação nos resíduos de lisina que são realizadas por histonas acetiltransferases (HAT) e histonas deacetilases (HDAC), respectivamente (Kucukali et al., 2015).

Embora o conceito de regulação epigenética da expressão gênica tenha mais de 70 anos, o campo da epigenética explodiu recentemente, com 98% das pesquisas epigenéticas publicadas nos últimos 15 anos (Sweatt, 2013). Muitas funções do SNC têm componentes epigenéticos significativos, incluindo determinação do destino das células-tronco neurais, plasticidade neural e aprendizado e memória (Neal & Richardson, 2018).

Vários estudos também investigaram a intervenção farmacológica de mecanismos epigenéticos em doenças neurodegenerativas (Neal & Richardson, 2018). Isso não é surpreendente, já que a idade é o principal fator de risco para várias doenças neurodegenerativas, incluindo AD e DP, e o aumento da idade tem sido associado a alterações na metilação do DNA (Hernandez, et al., 2011). Os pacientes com AD exibiram maior metilação de elementos repetitivos de DNA em comparação aos controles, o que poderia resultar em níveis alterados de metilação global do DNA (Bollati et al., 2011). Na DP, os mecanismos epigenéticos têm sido sugeridos para desempenhar um papel substancial, com diminuição da metilação do gene da α -sinucleína (Neal & Richardson, 2018). Goschl et al. (2018) demonstraram que camundongos HDAC1-cKO são resistentes à indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE), sugerindo que a inibição seletiva das HDAC pode ser uma nova estratégia de tratamento da EM.

1.3.3 Neuroinflamação, epigenética e a GSK-3 β

Apesar da influência bem reconhecida da GSK-3 β em numerosas funções celulares, a GSK-3 β como uma quinase que regula a inflamação é um conceito relativamente novo (Duda et al., 2018).

Devido à barreira hematoencefálica, a inflamação sistêmica tem geralmente apenas um impacto limitado no cérebro. No entanto, quando esta barreira é rompida, as células do sistema imunológico se infiltram no cérebro. Elas representam uma tentativa necessária para restaurar a homeostase cerebral, mas também podem ser prejudiciais, caso se tornem crônicas (Duda et

al., 2018). A observação de que a GSK3 influencia o equilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias na micróglia e em outros fatores que contribuem para a resposta inflamatória cerebral como os astrócitos fornecem novas alternativas no tratamento de doenças neurodegenerativas (Peña-Altamira et al., 2017). A literatura demonstra que a GSK-3 β regula mais de 20 fatores de transcrição os quais resultam na estimulação de células gliais (principalmente micróglia e astrócitos) e na manutenção do equilíbrio entre estados pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, seja na micróglia ativada como nos astrócitos, a GSK3 promove a liberação de IL-1 β , IL-6, TNF α e óxido nítrico (NO) e inibe a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Cao et al., 2017; Peña-Altamira et al., 2017). A micróglia geralmente responde primeiro à lesão, enquanto os astrócitos reforçam a resposta inflamatória (Duda et al., 2018). Além desta ligação entre a GSK3 e a neuroinflamação estudos recentes sugerem uma ligação entre a ativação das HDACs resultante da fosforilação GSK-3 β o qual promoveria a morte de células neurais (Bardai & D'Mello 2011). Vários estudos vêm demonstrando que a inibição conjunta da GSK-3 β e HDAC pode ser eficaz contra distúrbios neurológicos (Bardai et al., 2015). Sharma & Talyan, 2015 relataram que a inibição conjunta da GSK3 β e HDAC reduziram déficits cognitivos induzidos por estreptozotocina em ratos, Simone e colaboradores (2019) relatam terem descoberto o primeiro agente inibidor duplo da GSK-3 β e HDAC o qual foi considerado um composto promissor no combate a disfunções típicas da doença de Alzheimer.

1.3.4 Doença de Parkinson (DP)

1.3.4.1 Epidemiologia

A DP é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado por características motoras e não motoras, sintomas psiquiátricos, como depressão, ansiedade e psicose (Schneider et al., 2017). A prevalência de DP aumenta com a idade (Pringsheim et al., 2014) e o risco ao longo da vida de uma pessoa apresentar os sintomas da DP é de 2,0% para homens e 1,3% para mulheres (Elbaz et al., 2002). Estima-se que a DP atinja mais de 2% da população com mais de 65 anos de idade (Song et al., 2016) aumentando o ônus social e econômico para as sociedades à medida que a população envelhece (De Lau & Breteler, 2006). Aproximadamente 630.000 pessoas nos Estados Unidos foram diagnosticadas com DP em 2010, estes dados podem dobrar até 2040 (Bellou et al., 2016). Nos Estados Unidos, o ônus econômico da DP ultrapassou os US\$ 14,4 bilhões em 2010 (aproximadamente US\$ 22.800 por paciente) e projeta-se que estes valores podem crescer substancialmente nas próximas décadas (Kowal et al., 2013). Existem poucos

estudos epidemiológicos no Brasil, contudo acredita-se que exista cerca de 200 mil portadores da DP (Fernandes & Filho, 2018).

A doença de Parkinson é reconhecida como o distúrbio neurodegenerativo mais comum após a DA (Kalia & Lang 2015). A prevalência da doença de Parkinson parece ser maior na Europa (66 a 1500 por 100.000 habitantes) (Von Campenhausen et al., 2005), América do Norte (111 a 329 por 100.000 habitantes) (Strickland & Bertoni, 2004) e América do Sul (31 a 470 por 100.000 habitantes) (Bauso et al., 2012) em comparação com países africanos, asiáticos e árabes (Muangpaisan et al., 2009).

O risco da DP é determinado pela interação complexa e efeitos compostos de fatores de riscos genéticos e não genéticos (Bellou et al., 2016). Progressos substanciais foram feitos na decifração destes fatores recentemente (Nalls et al., 2014)

1.3.4.2 Doença de Parkinson: Manifestações clínicas

Os sintomas motores clássicos da DP foram reconhecidos como componentes proeminentes da doença desde a descrição inicial realizada por James Parkinson no Século XIX, e posteriormente refinados por Jean-Martin Charcot (Kalia & Lang 2015). Os sintomas parkinsonianos incluem bradicinesia, rigidez, tremor durante o repouso e comprometimento da postura durante o caminhar (Gibb & Lees, 1988). As características motoras em pacientes com DP são heterogêneas, o que levou a várias tentativas de classificar os subtipos da doença. (Marras & Lang, 2013). Um consenso sobre a classificação dos subtipos da DP ainda não foi estabelecido, mas observações clínicas empíricas sugerem dois subtipos principais: DP com tremor dominante (com relativa ausência de outros sintomas motores) e DP não tremor-dominante (que inclui fenótipos descritos como síndrome acinético-rígida e instabilidade postural no caminhar). A DP tremor-dominante é frequentemente associada com uma taxa de progressão mais lenta que a DP não tremor-dominante (Jankovic et al., 1990). Além disso, possíveis subtipos da doença com características não motoras incluem disfunção olfativa, comprometimento cognitivo, sintomas psiquiátricos, sonolência diurna excessiva, disfunção autonômica, dor e fadiga (Kalia & Lang 2015). Esses sintomas são comuns no início da DP e estão associados a redução da qualidade de vida dos paciente (Duncan et al., 2014).

1.3.4.3 Fisiopatologia

Os baixos níveis de dopamina (DA) (Fig. 3), a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNc) (Fig.4), presença de inclusões citoplasmáticas denominadas “corpos de Lewy” (LB) (formados principalmente por filamentos

de proteínas como α -sinucleína) (Fig. 5), recrutamento e ativação de micróglia e astróglia na SNc e o subsequente desenvolvimento de um processo inflamatório são as marcas patológicas da DP (Raza et al., 2019).

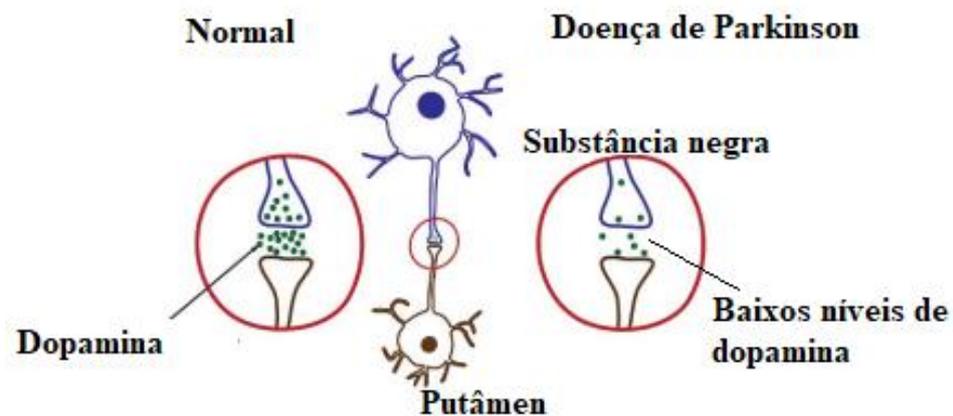
A SNc contém os neurônios nigrostriatais e os projeta para o putâmen. O padrão de perda de células da SNc aparece em paralelo aos níveis de expressão do transportador de dopamina (DAT) e é consistente com a conclusão de que a perda de DA é mais exacerbada no putâmen dorsolateral, o principal local de projeção para esses neurônios. No início dos sintomas, a DA do putâmen está depletada em torno de 60 a 80%. Os neurônios dopaminérgicos da SNc já foram perdidos (Raza et al., 2019). No entanto, os neurônios dopaminérgicos mesolímbicos adjacentes à SNc são afetados de forma limitada na DP e consequentemente, há um decréscimo significativamente menor de DA no núcleo caudado (Uhl et al., 1985). A neurodegeneração e a formação de LB na DP se estende além dos neurônios dopaminérgicos sendo encontradas em neurônios noradrenérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos bem como no córtex cerebral, bulbo óptico e sistema nervoso autônomo (Hornykiewicz & Kish, 1987). A degeneração das estruturas do hipocampo e as entradas corticais colinérgicas contribuem para a alta taxa de demência que acompanha a DP em pacientes mais idosos (Raza et al., 2019).

A DA no cérebro de pacientes com DP é oxidada para formar quinonas de dopamina e radicais livres por auto-oxidação ou por monoamina oxidases (MAO) de ligação à membrana mitocondrial tais como MAO-A (em neurônios) e MAO-B (na glia). Os produtos da oxidação da DA podem ciclizar para formar aminocromos, e são reativos o suficiente para produzir radicais superóxido (Norris et al., 2005). Sabe-se que neurônios dopaminérgicos são suscetíveis as reações reativas mitocondriais, especialmente as espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Dias et al., 2013). A acumulação de ROS é reportada como indutor de danos generalizados a componentes celulares. Além disso, alterações no DNA mitocondrial sob estresse induzido por ROS pode levar a enormes danos como a remoção genética de TFAM (fator de transcrição A, mitocondrial), um importante fator de transcrição, utilizado como indutor de neurodegeneração em camundongos (Raza et al., 2019).

Componentes inflamatórios da DP envolvem a desregulação das vias inflamatórias, provavelmente resultantes de pre-disposições genéticas juntamente com alterações imunes associadas ao envelhecimento, além da ativação primária da glia devido a lesão neuronal (Tiwari & Pal, 2017). Vários pesquisadores associam o envelhecimento à inflamação crônica leve na SNc, o que tornaria os neurônios dopaminérgicos mais vulneráveis à degeneração (Kanaan et al., 2010). A inflamação periférica ativa na DP contribui para a iniciação e/ou

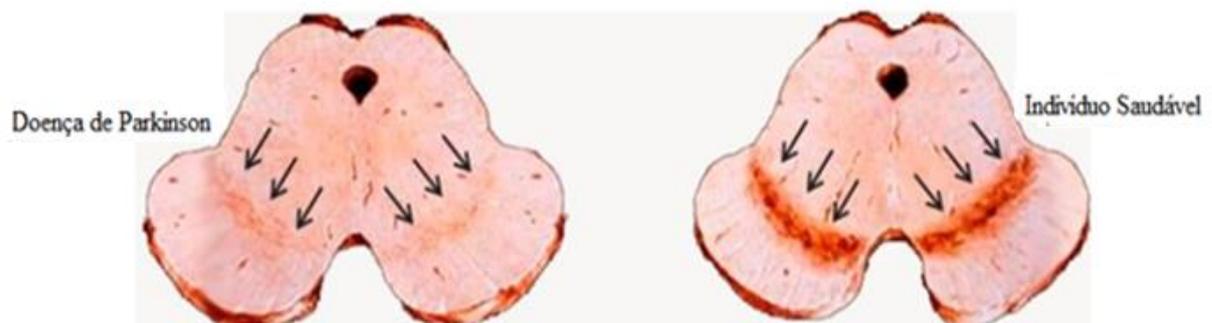
progressão da doença por exacerbação e/ou sinergia com a resposta inflamatória central promovendo a neurodegeneração dopaminérgica (Tiwari & Pal, 2017). A inflamação dos neurônios causa a liberação de vários mediadores inflamatórios (interferons, fator de crescimento epidérmico, IL-5, IL-6, fator de crescimento de hepatócitos), além da presença da microglia ativada (a qual secreta vários fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios como superóxido, TNF- α , IL-1 β , IL-6, e NO) e reativa a astrócitos no parênquima do SNC. Fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- κ B, STAT3, AP-1, TLRs e FAF1, são regulados positivamente na microglia ativada. TLRs, quando ativados, promovem a sinalização do NF- κ B e assim continua o ciclo vicioso da neuroinflamação (Figura 6) (Tiwari & Pal, 2017).

Figura 3. Produção reduzida de dopamina a partir de neurônios dopaminérgicos da SNC.



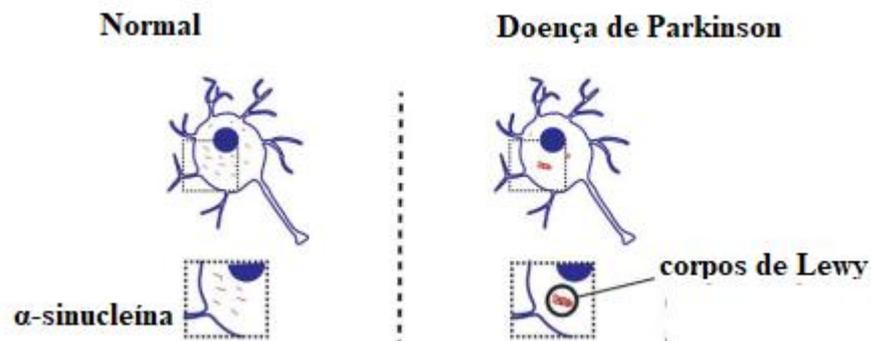
Fonte: Raza et al., 2019, adaptado.

Figura 4. Comparação da degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNC.



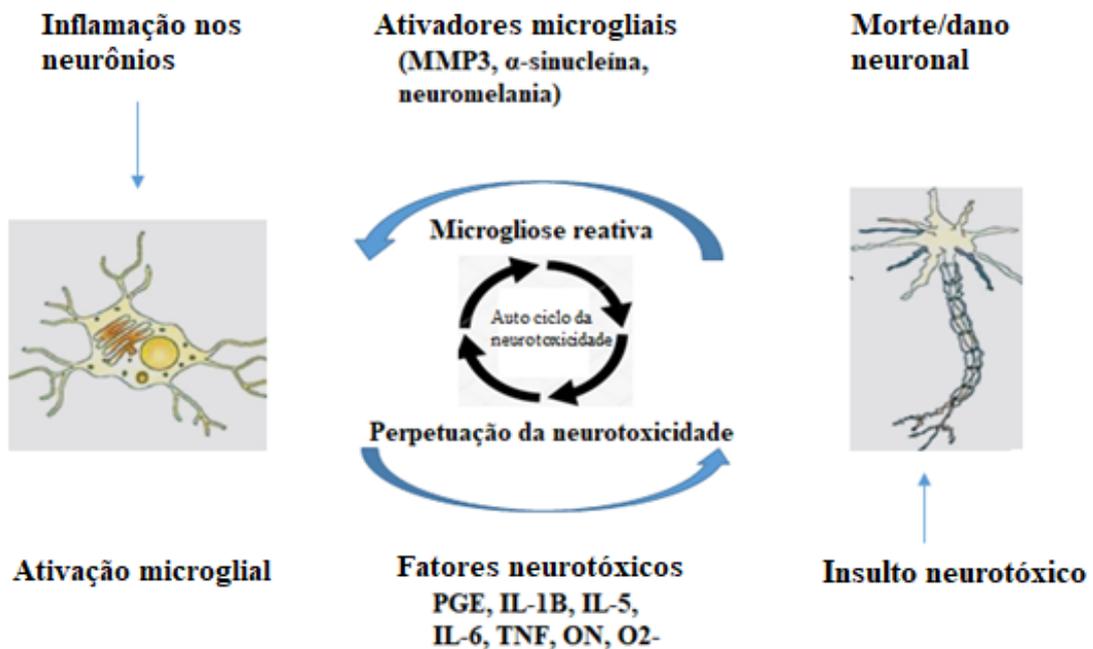
Fonte: Aguiar Junior, 2011, adaptado.

Figura 5. Formação de agregados de α -sinucleína como corpos de Lewy.



Fonte: Raza et al., 2019, adaptado.

Figura 6. Ciclo da viciosa da neuroinflamação.



Fonte: Tiwari & Pal, 2017, adaptado

1.3.4.4 Tratamentos atuais

Os tratamentos direcionados aos pacientes com DP visam melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas. Uma das abordagens mais utilizadas é o tratamento medicamentoso (Tabela 1) visando fornecer alívio dos sintomas, mas levando em consideração os efeitos colaterais e os níveis de tolerância de cada paciente (Raza et al., 2019). Além disso, os profissionais de saúde indicam aos pacientes com DP terapias ocupacionais, na tentativa de

possibilitar aos pacientes realizar atividades de forma independente por períodos mais longos. Possíveis intervenções cirúrgicas incluem terapia genética direcionada, transplantes de células, e estimulação cerebral profunda de núcleos subtalâmicos (Kordower & Bjorklund, 2013; Lindvall, 2013).

Drogas que aumentam as concentrações de dopamina intracerebral ou estimulam os receptores dopaminérgicos são a principal base de tratamento para os sintomas motores. Estas drogas incluem levodopa, agonistas de dopamina, monoaminas inibidores da oxidase tipo B e, menos comumente, amantadina (Connolly & Lang, 2014).

Tabela 1 - Drogas usadas no tratamento da doença de Parkinson. Adaptado de Raza et al., 2019.

Classes de medicamentos	Drogas específicas	Mecanismo de ação
Anticolinérgico	Triexifenidil Benzotropina Etopropazina	Bloqueiam os receptores de acetilcolina e evita a degeneração da dopamina
Inibidores da monoamina oxidase (MAO)	Selegilina	Bloqueia os receptores MAO-B para reduzir o metabolismo da dopamina
Medicamentos antivirais	Amantadina	Bloqueia os receptores NMDA e acetilcolina, além de promover a liberação de dopamina
Agonistas de dopamina	Bromocriptina Pergolide Ropinirol Pramipexol	Estimulam diretamente os receptores de dopamina
Combinações de L-dopa	L-dopa / Carbidopa L-dopa / Benserazide Sinemet CR	Metabolismo da dopamina em células contendo dopa-descarboxilase
Inibidor da Catecol- <i>O</i> -metil transferase (COMT)	Entacapone	Bloqueia a atividade periférica da COMT para reter catecolaminas

Fonte: Raza et al., 2019.

1.3.4.5 Modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

A 6-OHDA é a droga mais frequentemente usada para induzir a neurodegeneração do sistema nigrostriatal, devido sua seletividade para os neurônios dopaminérgicos da SNc. A 6-OHDA é um análogo estrutural da dopamina (Fig.7), altamente oxidável que pode ser levada pelo transportador de dopamina, acarretando danos seletivos aos neurônios catecolaminérgicos, como os neurônios dopaminérgicos do SNc (Baltazar et al., 2017).

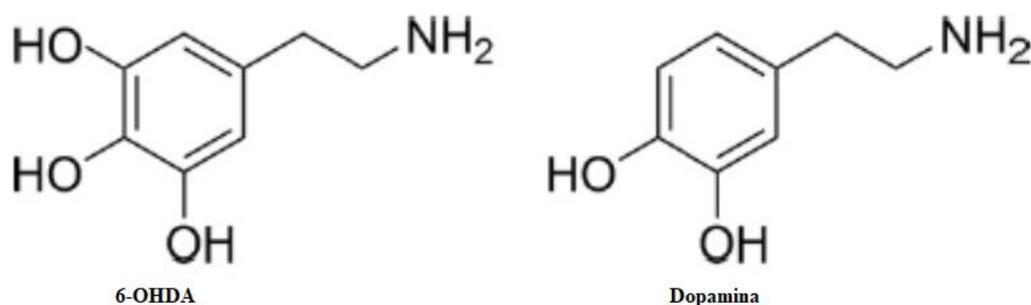
A 6-OHDA não possui capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, assim requer a administração direta usando procedimentos estereotáxicos para que possa gerar toxicidade ao SNC (Maasz et al., 2017). A 6-OHDA é especificamente captada a partir de terminais pré-sinápticos de neurônios dopaminérgicos através do DAT (Maasz et al., 2017). Nos neurônios dopaminérgicos a 6-OHDA é oxidada produzindo radicais livres, incluindo o peróxido de hidrogênio, levando à morte neuronal por meio de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. A 6-OHDA é preferencialmente usada para induzir lesões unilaterais no SN e associada a deficits no sistema motor (Raza et al., 2019).

Até o momento, três mecanismos foram propostos para explicar o efeito citotóxico da 6-OHDA (Baltazar et al., 2017):

- 1) Auto-oxidação intra-celular ou extra-celular da 6-OHDA, a qual favorece a produção de peróxido de hidrogênio e radicais superóxido e hidroxila.
- 2) Formação de peróxido de hidrogênio devido à ação da monoamina oxidase.
- 3) Inibição direta do complexo da cadeia respiratória mitocondrial I.

Esses mecanismos podem agir de forma dependente ou em combinação para gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS). O estresse oxidativo pode ser intensificado por um aumento no cálcio livre citoplasmático (assim como a excito toxicidade do glutamato ou perda da permeabilidade da membrana mitocondrial), induzindo finalmente a morte celular (Baltazar et al., 2017).

Figura 7. 6-OHDA estruturalmente análogo a dopamina.



Fonte: Baltazar et al., 2017

1.3.5 Esclerose Múltipla

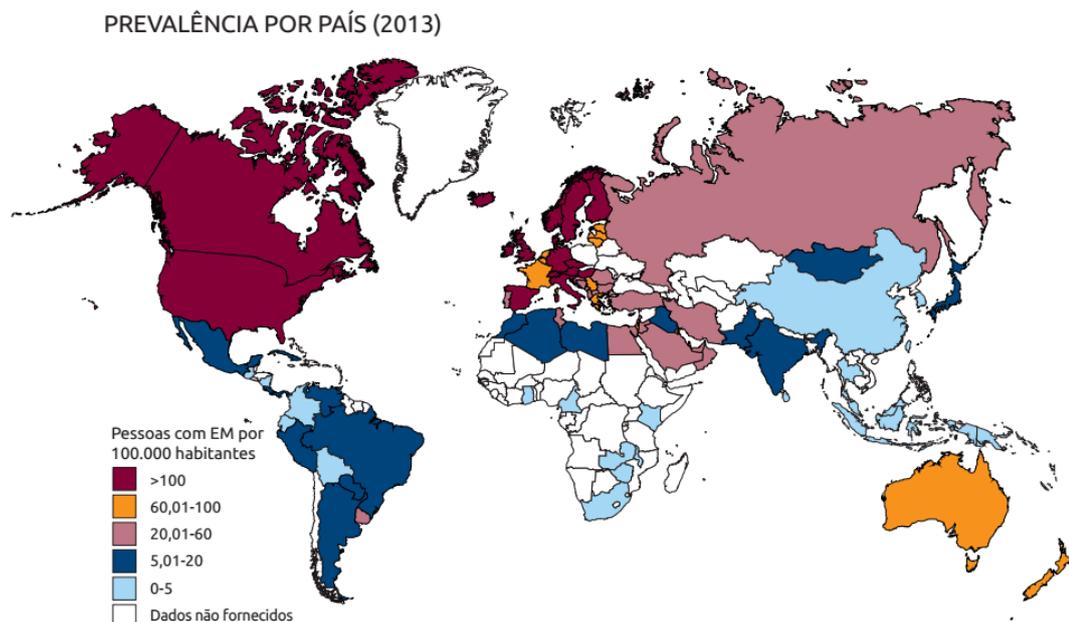
1.3.5.1 Epidemiologia

As características clínicas e epidemiológicas da EM podem variar de acordo com fatores ambientais e genéticos (Mero et al., 2013). Segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM), a EM é uma doença neurológica, crônica e autoimune, ou seja, as células de defesa do organismo atacam o próprio SNC, provocando lesões cerebrais e medulares.

O número estimado de pessoas com EM aumentou de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões em 2013 no mundo segundo a Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF). No Brasil, segundo dados da ABEM, existem cerca de 35.000 indivíduos portadores de EM, sendo que aproximadamente 10.376 desses portadores estão em tratamento no Sistema Único de Saúde (SUS). A prevalência média global usada para calcular esse número aumentou de 30 (em 2008) para 33 por 100.000 habitantes (em 2013). Não está claro se esse aumento se deve a melhores diagnósticos e novas ferramentas de diagnóstico ou ainda a outras causas (ABEM, 2013). A EM tende a se manifestar na faixa etária dos 20 aos 40 anos (geralmente mais cedo em mulheres). Antes dos 18 anos de idade a porcentagem dos casos é de apenas 10% sendo mais rara em crianças com menos de 10 anos (Mandia et al., 2014).

A incidência desta patologia detém-se entre os 140 casos por 100.000 habitantes na América do Norte, 108/100.000 habitantes em parte da Europa (ABEM, 2013, Fig. 8).

Figura 8. Prevalência da EM por país em 2013.



Fonte. ABEM

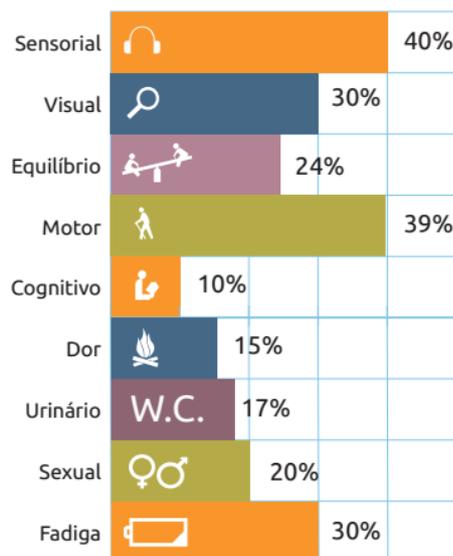
1.3.5.2 Esclerose Múltipla: Manifestações clínicas

A complexidade da doença depende do tamanho, localização e da duração das lesões no SNC, as quais são variáveis e imprevisíveis. Essa imprevisibilidade leva a uma grande gama de sintomas, e além disso pode apresentar-se de forma abrupta ou insidiosa. Raramente a EM ocorre de forma assintomática (Sahraian et al., 2010).

Do ponto de vista clínico, a doença se manifesta alternando períodos de exacerbações e remissões. O curso clínico varia de paciente para paciente. A apresentação clínica da doença foi modificada nos últimos anos, devido às novas terapias, que modificaram o seu curso clínico (Pereira et al. 2012). Entretanto, diversos sintomas, provavelmente acarretados pela desmielinização do SNC ou do bloqueio da transmissão do impulso nervoso no nível dos axônios ainda contribuem para a redução da qualidade de vida dos pacientes (Moreira et al., 2008). Moreira et al., (2008) listam os sintomas mais frequentes, como observado abaixo:

- Distúrbios da visão;
- Alterações sensitivas;
- Alterações motoras e espasticidade;
- Alterações da coordenação e equilíbrio;
- Alterações a nível intestinal, vesical e sexual;
- Fadiga;
- Alterações psicológicas e cognitivas.

Figura 9. Porcentagem dos sintomas clínicos de EM.



Fonte. ABEM

1.3.5.3 Fisiopatologia

A grande diferença fisiopatológica da EM das outras doenças inflamatórias do SNC é a presença de grandes placas de desmielinização e em vários locais (Fig. 10), as quais levam à formação de cicatrizes gliais (Lassmann, 1998). Devido a isso a EM é classicamente definida como uma doença inflamatória que tem como principal característica fisiopatológica a formação de placas desmielinizantes no SNC (Sá et al., 2011).

A relação da EM com genes de complexos de histocompatibilidade, a presença de infiltrados inflamatórios na substância branca, a sua semelhança com modelos experimentais e ainda a constatação de que a EM responde de forma positiva a terapias com imunomoduladores e imunossupressores, reforçam a tese de que a auto-imunidade possui um papel central na sua fisiopatologia (Hafler et al., 2005).

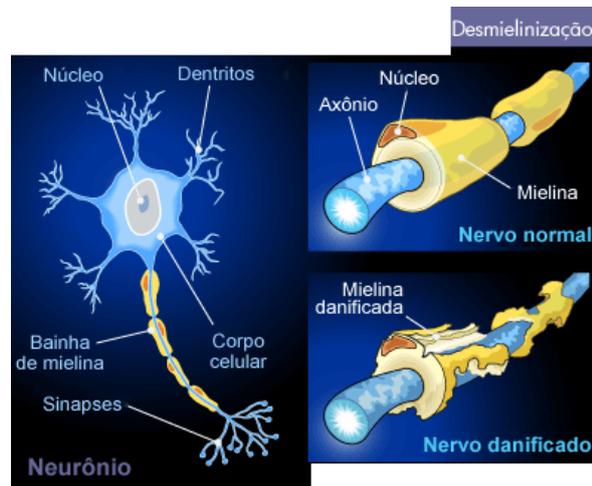
A EM tem início na periferia, onde as células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam os antígenos para os linfócitos T CD4⁺ (Figura 11), ativando-os e acarretando na geração de subpopulações auto reativas pró-inflamatórias, as células T helper 1 e 17 (Th1 e Th17) (Ramos, 2014). No SNC, os antígenos-alvo são reconhecidos (na maioria das vezes por proteínas presentes na mielina) pelas células T auto reativas, o que acaba fortalecendo a resposta. As células pró-inflamatórias Th1 e Th17 se proliferam, os linfócitos B começam a sua maturação para a secreção de anticorpos ativando os macrófagos (Prineas et al., 2012). A EM é fundamentalmente, uma doença autoimune mediada por células Th1/Th17 com especificidade para antígenos do SNC. Essa afirmativa baseia-se tanto no quadro histológico, que envolve a infiltração de macrófagos e linfócitos T e B (Lucchinetti et al., 2000) como no fato de citocinas como IFN γ , IL-17 e TNF- α , estarem envolvidas no processo inflamatório e subsequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (Furuzawa-Carballeda et al., 2007).

O processo de formação das placas desmielinizantes representam o estágio final de várias etapas as quais incluem: inflamação multifocal, rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), desmielinização, remielinização, perda de oligodendrócitos, gliose reativa e degeneração axonal e neuronal (Ramagopalan et al., 2011). Os linfócitos T CD4⁺ (reativos à mielina) migram através da BHE para o SNC, de forma ainda não elucidada, tornando-se ativos através de um mecanismo de mimetização molecular, e ao encontrarem um antígeno específico (neurofascína, alfa β -cristalina ou proteínas da mielina) dão início a uma resposta inflamatória através da produção de citocinas pró inflamatórias, além do recrutamento de outras células inflamatórias tais como as células micróglia, os linfócitos B e os macrófagos (Compston et al 2008).

A EM é considerada uma doença autoimune justamente por este processo desmielinizante, induzido quando células específicas do sistema imunológico, os linfócitos Th1 reconhecem componentes da bainha de mielina, levando a ativação da micróglia e ao recrutamento de macrófagos (Hafler et al., 2005).

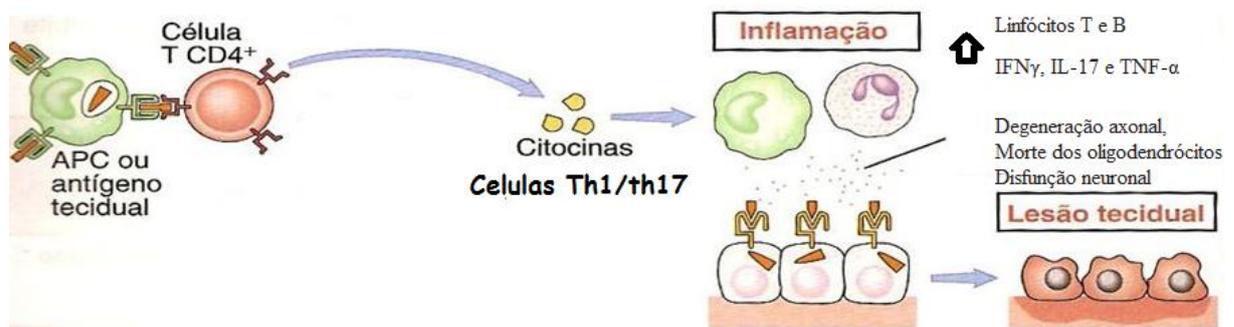
A EM possui características histopatológicas bem definidas: a desmielinização ocasionada pela destruição da bainha de mielina ou pela morte dos oligodendrócitos, a presença de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos T, B e de macrófagos, dano ou perda dos axônios e gliose caracterizada pelo aumento do número de células da glia na substância branca em resposta ao dano sofrido no SNC (Constantinescu et al., 2011).

Figura 10. Placas de desmielinização.



Fonte: ABEM, 2013

Figura 11. Processo de ativação das células T CD4+.



Fonte: Peakman et al., adaptado, 2011

1.3.5.4 Formas e diagnóstico

Segundo a ABEM existem 4 tipos de EM, que são:

- EM Remitente-Recorrente (EMRR); que ocorre em aproximadamente 85% dos casos. Caracteriza-se por surtos ou ataques seguidos por recuperação parcial ou total dos sintomas. Biologicamente, caracteriza-se por áreas focais de inflamação e desmielinização, que se resolvem ao longo do tempo e conduzem à recuperação dos pacientes, até nova recorrência, se encontram estáveis a nível neurológico. Deste modo, o dano causado pela inflamação é pelo menos parcialmente reversível. A EMRR é forma de EM mimetizada pela EAE, em modelos experimentais com camundongos e baixas doses de MOG: 35–55.
- EM Secundária Progressiva (EMSP); é o segundo tipo mais comum de EM uma vez que cerca de 80% dos casos de EMRR irão desenvolver EMSP (Fig. 12). EMSP é caracterizada por recaídas iniciais de EMRR, que, ao longo do curso da doença, são substituídas por declínio funcional progressivo. Indivíduos com EMSP começam com disfunção neurológica reversível, mas, por razões desconhecidas, ocorre degeneração axonal levando a danos irreversíveis, que se apresenta clinicamente como EM progressiva.
- EM Primária Progressiva (EMPP); A EMPP se caracteriza progressiva incapacidade dos pacientes sem fases remitentes. Desta forma os pacientes com este subtipo clínico sofrem danos irreversíveis os quais acarretam uma progressão lenta, e um aumento da deficiência com pouco ou nenhum alívio sintomático. Ocorre em cerca de 10% dos casos.
- EM Progressiva Recorrente (EMPR); o subtipo clínico de menor ocorrência, sua frequência chega no máximo a 5% dos casos. Este subtipo se caracteriza pela deterioração progressiva desde o início dos sintomas, semelhante à EMPP, entretanto também envolve ataques agudos ou recaídas. A maior parte do processo biológico é clinicamente silencioso e o tamanho da lesão não está correlacionada necessariamente com o tamanho ou intensidade da incapacidade.

Vale salientar que os vários sintomas podem aparecer em cada um dos quatro tipos clinicamente definidos de EM. Não existem orientações de consenso sobre um mínimo de exames e testes que se deva fazer quando se existe a suspeita de EM uma vez que várias patologias cursam com a desmielinização do SNC que podem mimetizar o ponto de vista clínico e laboratorial a EM (Nicoletti et al., 1996).

Figura 12. Tipos de EM no diagnóstico



Fonte: ABEM, 2013

1.3.5.5 Tratamentos atuais

A EM ainda é uma doença sem cura, o tratamento medicamentoso da EM ainda é motivo de discussão, mas as atuais formas de tratamento para a EM, baseiam-se na redução da atividade inflamatória e regulação do sistema imune, na tentativa de reduzir os danos e controlar sua progressão (Gallud et al., 2006). As principais drogas utilizadas são: glicocorticoides e corticosteroides, imunomoduladores, imunossuppressores, anticorpos monoclonais e interferon, além de outras intervenções como a plasmaferase e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (Lana-Peixoto et al. 2002). No entanto, estes agentes e intervenções apresentam uma eficácia modesta e apresentam altos níveis de toxicidade (Ge et al., 2013). Um número cada vez maior de estudos vem mostrando que os inibidores das histonas deacetilases (HDAC) têm efeitos benéficos sobre doenças autoimunes e inflamatórias (Ge et al., 2013). Partindo dessas informações a crisina já apresentou na literatura efeitos inibitórios in vitro das HDAC (Pal-Bhadra et al., 2012; Kanwal et al., 2016) efeitos anti-inflamatórios e recentemente Pingili e colaboradores (2019) sugeriram que a crisina também possui efeitos protetores contra hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidas por diversos agentes tóxicos.

1.3.5.6 Modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A EAE é o principal modelo animal para realizar estudo sobre a EM. O modelo foi utilizado inicialmente em 1933 por Thomas Rivers. Rivers percebeu que ao administrar extratos de cérebro de coelho em macacos Rhesus os macacos desenvolviam um tipo de paralisia e esta condição era diretamente dependente da quantidade de mielina que havia no extrato administrado no animal (Epps, 2005). Apesar de os modelos experimentais apresentarem limitações para a compreensão das doenças humanas, os estudos utilizando a EAE tem sido, de fato, muito produtivo desde o início da sua utilização (Mix et al., 2008).

O modelo da EAE pode ser induzido em diferentes tipos de animais de laboratório após a sensibilização com antígenos da mielina, emulsionados em adjuvante completo de Freund (CFA) (Gold et al., 2006). As características clínicas e patológicas da doença dependem do auto antígeno e dos adjuvantes utilizados, bem como da espécie, e sexo dos animais como apresentado na tabela 2 (Van Der Star et al., 2012).

Além da debilidade motora existem várias outras semelhanças entre a EAE e a EM. A presença de infiltrado inflamatório de células T CD4+ e a desmielinização axonal, são algumas das características encontradas no cérebro de pacientes com EM e que também são encontradas no modelo de EAE (Goverman, 2009). Estas semelhanças entre os dois quadros patológicos fazem da EAE um modelo útil no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da EM (Goverman, 2009).

Tabela 2: Modelos clássicos de EAE.

Curso da doença	Animal	Linhagem	Antígeno
Remitente-recorrente	Camundongo	SJL/J	PLP:139–151
Remitente-recorrente	Camundongo	C57BL/6	Low dose MOG:35–55
Remitente-recorrente	Rato	Dark agouti	MOG:1–125
Crônica	Rato	C57BL/6	MOG:35–55
Crônica	Camundongo	C57BL/6	PLP:178–191
Crônica	Camundongo	C57BL/6	MP4
Crônica	Camundongo	Lewis N1	MOG
Monofásica	Rato	B10.PL	PBM
Monofásica	Camundongo	PL/J	PBM
Monofásica	Camundongo	Lewis	PBM

Fonte: Van Der Star et al., 2012, Adaptada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos do flavonoide crisina em dois modelos animais de doenças neurodegenerativas, no modelo da DP induzido pela 6-OHDA e no modelo animal de EM da EAE.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 No modelo da DP induzido por 6-OHDA

- Analisar parâmetros comportamentais e cognitivos em camundongos após a administração da 6-OHDA e da crisina (10 mg/kg i.g);
- Analisar os parâmetros neuroquímicos relacionados ao estresse oxidativo em camundongos após a administração da 6-OHDA e do tratamento com crisina (10 mg/kg i.g);
- Analisar o efeito da crisina na atividade das enzimas Na⁺, K⁺-ATPase e NADPH oxidase em camundongos após a administração da 6-OHDA;
- Analisar os níveis da dopamina e seus metabólitos no estriado de camundongos após a administração da 6-OHDA e do tratamento com crisina (10 mg/kg i.g);

2.2.2. No modelo de EM da EAE

- Analisar o efeito da crisina frente os escores clínicos do modelo EAE;
- Analisar o efeito da crisina na atividade das HATs, HDAC e da GSK-3 β após a indução da EAE.
- Avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias após a indução da EAE e do tratamento com crisina (20 mg/kg i.g);

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados que fazem parte desta tese de doutorado estão apresentados sob a forma de dois artigos publicados. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios documentos e representam a íntegra deste estudo. O primeiro artigo está publicado na revista “Neuroscience Letters”. O segundo artigo está publicado na revista “Journal of Neuroimmunology”.

3.1. Artigo 1

Crisina protege contra alterações comportamentais, cognitivas e neuroquímicas em um modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxiopamina.

Lucian Del Fabbro, André Rossito Goes, Cristiano Ricardo Jesse, Marcelo Gomes de Gomes, Leandro Cattelan Souza, Fernando V. Lobo Ladd, Aliny A.B. Lobo Ladd, Ricardo Vinicius Nunes Arantes, Astor Reis Simionato, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Silvana Peterini Boeira.

Neuroscience Letters 706 (2019) 158–163.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Chrysin protects against behavioral, cognitive and neurochemical alterations in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease

Lucian Del Fabbro^a, André Rossito Goes^a, Cristiano Ricardo Jesse^a, Marcelo Gomes de Gomes^{a,b}, Leandro Cattelan Souza^a, Fernando V. Lobo Ladd^c, Aliny A.B. Lobo Ladd^d, Ricardo Vinicius Nunes Arantes^e, Astor Reis Simonato^f, Mauro Schneider Oliveira^g, Ana Flavia Furian^{h,*}, Silvana Peterini Boeira^a

^aLaboratory of Pharmacological and Toxicological evaluations applied to Bioactive Molecules (Lafambio Pampa), Federal University of Pampa, Campus Itaquí, 97650-000 Itaquí, RS, Brazil

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa Campus, Uruguaiana, RS, Brazil

^cDepartment of Morphology, Laboratory of Neuroanatomy, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^dLaboratory of Stochastic Stereology and Chemical Anatomy, Department of Surgery, College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, SP, Brazil

^eLaboratory of Histology, Department of Biological Sciences, Bauru Dental School University of São Paulo, SP, Brazil

^fLaboratory of Optimization of Sports Performance Human (LaBOEH), São Paulo State University, Bauru, SP, Brazil

^gLaboratory of Neurotoxicity and Psychopharmacology (LABNEURO), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^hLaboratory of Pharmacology, Mycotoxins and Toxicology (LAFARMT), Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Neuroinflammation
Oxidative stress
Behavior
Dopaminergic neurons
Old-mice

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative disorder that severely affects quality of life of patients and their families. The flavonoid chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a naturally occurring flavone with several pharmacological activities, including anti-inflammatory and anti-oxidative. We investigated the effects of a 28-day chrysin treatment (10 mg/kg/day, i.g.) on a model of PD induced by 6-OHDA in aged (20-month old) mice. We found a protective effect of chrysin on behavioral and cognitive alterations (rotational behavior, passive avoidance and Barnes maze tests), nitric oxide synthesis (NOx), lipid peroxidation (HNE), glutathione levels (GSH), reactive species levels (RS), neuroinflammation (interleukin-1 beta - IL-1 β and tumor necrosis factor alpha - TNF- α), Na⁺, K⁺-ATPase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity (NADPH oxidase) activities. In addition, chrysin protected against changes in striatal dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) levels. In conclusion, chrysin improved several behavioral, cognitive and neurochemical parameters in a relevant preclinical model of PD in aged mice.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most commonly reported age-related neurodegenerative disorder and it is substantially characterized by dopamine (DA) depletion in the striatum and progressive degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system [25]. Damage of oxygen-derived free radicals, as well as neuroinflammation and lipid peroxidation are important mechanisms contributing to dopaminergic neuron degeneration, although the pathogenesis of PD is not clear. While most of typical motor impairments in PD reflect loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, PD affects multiple neuronal

systems both centrally and peripherally, leading to a constellation of non-motor symptoms including affective disorders, memory impairments, as well as autonomic and digestive dysfunction [22].

A variety of antioxidants have demonstrated neuroprotective activity in either *in vitro* or *in vivo* models of PD [15,19]. The naturally occurring flavonoid chrysin (5,7-dihydroxyflavone) has a wide range of biological and pharmacological properties, such as anti-inflammation, anti-oxidation and neuroprotective effects [12,13,21,24]. For instance, chrysin prevents age-elicited cognitive decline and oxidative stress in mice [24]. Moreover, chrysin attenuates the behavioral and neurochemical consequences of chronic unpredictable stress in mice,

* Corresponding author at: Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 43, Sala 4217, CEP - 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

E-mail address: ana.furian@ufsm.br (A.F. Furian).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.05.036>

Received 3 February 2019; Received in revised form 15 May 2019; Accepted 18 May 2019

Available online 20 May 2019

0304-3940/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

suggesting an antidepressant role of chrysin [12]. In this context, present study investigated the effects of chrysin on behavioral, cognitive and neurochemical alterations elicited by 6-OHDA injection in the striatum of aged mice, a well-established model of PD.

2. Materials and methods

2.1. Animals and drugs

Female C57B/6J mice (30–40 g, 20 months old) were maintained under standard, controlled environmental conditions (22–25 °C, free access to water and food, 12:12 h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m.). This study was conducted with the approval of Ethical Committee for Animal Use of Federal University of Pampa, Brazil (CEUA/Unipampa protocol # 038/2012). Chrysin (CAS NUMBER 480-40-0, purity 97%, Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.9% NaCl (final pH adjusted to 7.4).

2.2. Experimental design

Mice were randomly assigned into four groups (n = 10 per group): (1) Vehicle/Vehicle; (2) Vehicle/Chrysin; (3) 6-OHDA/Vehicle and (4) 6-OHDA/Chrysin. The mice were subjected to stereotaxic surgical injections of 6-OHDA or vehicle. Seven days after the injections, treatment with chrysin (10 mg/kg, i.g.) was initiated for 28 days [13], afterward behavioral and memory tests, mice were euthanized, and the striatum was removed for biochemical assays. An overview of experimental design is shown in Fig. 1.

2.3. Stereotaxic surgery injection of 6-OHDA

Surgery was performed under anesthesia with 10 mL/kg of 1% ketamine (Bela-Pharm, Vechta, Germany) and 0.2% xylazine (Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany). 6-OHDA (Sigma; 5 µg in 2 µL 0.9% NaCl with 0.2 µg/L ascorbic acid) was injected slowly (0.5 µL/min) into the right striatum (0.9 mm anterior and 1.8 mm lateral from bregma, 3.0 mm ventral from the dura). After the injection, the syringe was kept for additional 3 min in the brain, before it was slowly retracted. Controls were vehicle-injected.

2.4. Behavioral assessment

2.4.1. Open-field test (OFT)

The animals were submitted individually for a period of 5 min to an OFT apparatus (EP 154C, Insight LTDA, Brazil) 24 h after pretreatment, and the distance traveled was recorded (unit:mm) [24].

2.4.2. Passive avoidance test

The aversive memory was assessed as previously described by

Dall'Igna et al. [6] using a two-compartment apparatus (EP 112, Insight LTDA, Brazil) 50 × 22 × 27 cm; length x width x height) from Insight (Brazil). Test consisted of an acquisition trial (training) and two test sessions (15 min after training - early memory and 24 h after training - late memory). The latency time to enter the dark compartment was measured, with a cutoff time of 300 s.

2.4.3. Rotational behavior

Apomorphine-induced rotational behavior was evaluated according to Goes et al. [13]. The number of 360° contralateral turns was counted during 60 min.

2.4.4. Barnes maze

Spatial learning and working memory were evaluated using the Barnes maze [9]. The maze consisted of a circular platform (92-cm diameter) surrounded by 20 holes (5-cm diameter), one providing an escape route. In the spatial acquisition phase, animals were subjected to four trials per day for four consecutive days, with a constant inter-trial interval time of 20 min. The number of holes explored, and the time required to locate the escape hole were recorded. For the reference memory phase or probe trials, animals were tested on the 5th day (short-term retention) and 12th day (long-term retention) following the first trials, omitting training sessions between test trials. During the probe trials, the escape route was removed. The mouse was tested during a 90 s period. The latency and number of errors to reach the virtual target hole was recorded.

2.5. Tissue preparation

After behavioral tests, mice were euthanized with barbiturate overdose (pentobarbital sodium 150 mg/kg, i.p.). Striatum were removed and rapidly homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2400 × g for 15 min at 4 °C and a low-speed supernatant fraction (S₁) was used for assays.

2.6. Neurochemical assays

2.6.1. NOx

The content of NO₂ plus NO₃ (NOx) as a marker of NO synthesis was assayed spectrophotometrically as described by Donato et al. [8]. Results are expressed in nmol/mg protein.

2.6.2. GSH levels

GSH content was determined fluorometrically according the methodology described in detail by Hissin and Hilf [14]. Fluorescence excitation/emission wavelengths were 350 and 420 nm, respectively. GSH levels were expressed as nmol/g of tissue.

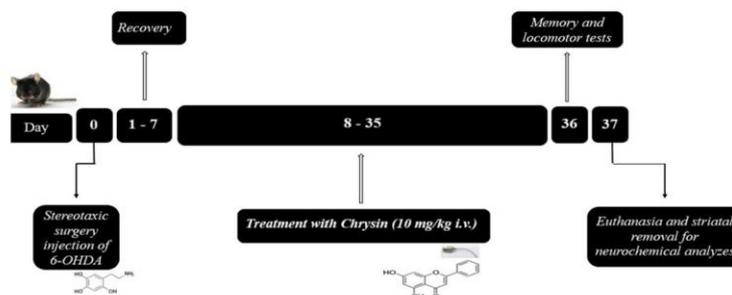


Fig. 1. Overview of study design.

2.6.3. HNE concentration

Concentration of HNE in the striatum was determined using a colorimetric assay kit (HAE-586; OXIS International) according to the manufacturer's instructions.

2.6.4. RS levels

RS levels were determined by a spectrofluorimetric method based on DCHF-DA assay, as described in detail by Souza et al. [24]. Fluorescence excitation/emission wavelengths were 480 and 520 nm, respectively. RS levels were expressed as arbitrary units (AU).

2.6.5. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity

NADPH oxidase activity was measured according to Ferreira et al. [11] in the presence or absence of the inhibitor diphenyleioidonium (10 μ M). Results were expressed as pmol NADPH consumed/mg protein/min.

2.6.6. Na^+ , K^+ -ATPase activity

Na^+ , K^+ -ATPase activity was measured according to Souza et al. [24] in the presence or absence of the inhibitor ouabain (0.1 μ M). Results were expressed as nmol Pi/mg protein/min.

2.6.7. DA, DOPAC and HVA levels

Dopamine and its metabolites DOPAC and HVA were measured using an HPLC system (Shimadzu; Kyoto, Japan) with an electrochemical detector (ECD; Eicom, Kyoto, Japan) [10]. The appendant potential of the ECD (carbon electrode vs. Ag/AgCl reference electrode) was set at 700 mV. The analytic column was a TSKgel Super-ODS (4.6 mm I.D. 9 100 mm; Tosoh, Tokyo, Japan), and the mobile phase consisted of 0.1 M citrate-sodium acetate buffer (pH 3.9) containing methanol (18%, v/v), disodium EDTA (4 mg/l), and sodium octanesulfonate (0.8 mM). Results were expressed as ng/mg protein.

2.6.8. Interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Levels of IL-1 β and TNF- α in the striatum were determined using commercially available ELISA assays, following the manufacturer's instructions (DuoSet Kits, R&D Systems; Minneapolis). Results were expressed as pg/mg tissue.

2.6.9. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically according to the method of Bradford [3].

2.7. Statistical analysis

Results were presented as means \pm S.E.M. Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way (chrysin = independent variable) or two-way ANOVA (6DA \times chrysin treatments = independent variables) followed by Tukey's test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was significant. All tests and plotting graphics were executed using the GraphPad prism 6 software (San Diego, CA, U.S.A.).

3. Results

3.1. Behavioral assessment

Fig. 2A–D demonstrated the effects of chrysin on locomotor activity, early/late memory and rotational behavior. Two-way ANOVA revealed that treatments did not change total distance traveled in OFT ($F_{1,16} = 0.03255$; $p = 0.8591$). However, early memory in passive avoidance test, 6-OHDA decreased time when compared to that of animals in Vehicle/Vehicle group ($F_{1,16} = 72.18$; $p < 0.0001$). Chrysin protected against impairment in early memory deficits in passive avoidance test caused by 6-OHDA ($F_{1,16} = 12.17$; $p = 0.0030$, Fig. 2B). Additionally, 6-OHDA decreased time in passive avoidance test in late

memory ($F_{1,16} = 8.744$; $p = 0.0093$) when compared to animals in Vehicle/Vehicle group, and chrysin protected against impairment caused by 6-OHDA ($F_{1,16} = 4.809$; $p = 0.0434$, Fig. 2C).

Contralateral rotation test showed that animals in the 6-OHDA/Vehicle group increased contralateral rotations when compared to that Vehicle/Vehicle group ($F_{1,16} = 121.4$; $p < 0.0001$). Chrysin protected against increased contralateral rotation caused by 6-OHDA ($F_{1,16} = 29.15$; $p < 0.0001$, Fig. 2D).

The effects of chrysin and 6-OHDA on spatial learning are presented in Fig. 2E–J. No significant differences were found in time to target or number of errors during the spatial acquisition phase (four trials per day for four consecutive days) (Fig. 2E and F). However, in the 5th day 6-OHDA increased time to target when compared to that of animals in Vehicle group (Fig. 2G), without altering the number of errors (Fig. 2H). Additionally, in the 12th day 6-OHDA increased time to target and number of errors when compared to animals treated with vehicle ($F_{1,20} = 4.818$; $p = 0.0401$) (Fig. 2I and J). Importantly, chrysin protected against impairment in spatial learning deficits in Barnes maze test caused by 6-OHDA ($F_{1,20} = 6.133$; $p = 0.0223$).

3.2. Neurochemical biomarkers determination

In order to evaluate the role of oxidative stress on the effects induced by 6-OHDA and the protective effect of chrysin, we measured oxidative stress markers in the striatum of mice. Statistical analyses revealed that 6-OHDA increased NOx levels and that chrysin prevented such increase (Fig. 3A). Animals in the 6-OHDA/Vehicle group showed decreased GSH levels in striatum when compared to that of animals in Vehicle/Vehicle group. Chrysin protected against 6-OHDA-induced decrease in GSH levels (Fig. 3B). Moreover, chrysin prevented the increase of HNE and RS levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (Fig. 3C and D), indicating an improvement in the antioxidant defense system.

Fig. 3E shows that administration of 6-OHDA markedly increased NADPH oxidase activity in striatum of mice ($F_{1,16} = 35.74$; $p < 0.0001$), and chrysin prevented this effect ($F_{1,16} = 13.98$; $p = 0.0018$). Moreover, treatment with 6-OHDA significantly decreased Na^+ , K^+ -ATPase activity in striatum of mice. Chrysin attenuated the reduction of Na^+ , K^+ -ATPase activity caused by 6-OHDA (Fig. 3F).

In order to investigate the involvement of dopamine metabolism pathway in protective effects of chrysin, we determine the levels of DA, DOPAC and HVA in striatum of mice after 6-OHDA treatment. Statistical analysis showed that 6-OHDA/Vehicle group significantly decreased DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice. Interestingly, chrysin partially restored DA, DOPAC and HVA levels (Fig. 3G–I, respectively).

We also investigated the protective effect of chrysin on pro-inflammatory cytokines levels. 6-OHDA administration significantly elevated IL-1 β and TNF- α levels in striatum of mice ($F_{1,12} = 31.24$; $p = 0.0001$) and ($F_{1,12} = 23.92$; $p = 0.0004$). Treatment with chrysin prevented the increase of IL-1 β and TNF- α levels caused by 6-OHDA ($F_{1,12} = 7.465$; $p = 0.0182$, Fig. 3J), ($F_{1,12} = 8.214$; $p = 0.0142$, Fig. 3K).

4. Discussion

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative diseases affecting over 2% of the population over 65 years of age [23]. Present study shows the protective effects of chrysin treatment on behavioral and cognitive tests as well as in neurochemical parameters (oxidative stress, neuroinflammation and dopamine metabolism) in a model of PD induced by 6-hydroxydopamine in female aged mice.

PD is a multisystem disorder showing initially a progressive deterioration of the dopamine nigrostriatal pathway and subsequent dysfunction of the basal ganglia-thalamo-cortical motor circuitry [2]. Here we showed that chrysin protect against a decrease in DA, DOPAC and

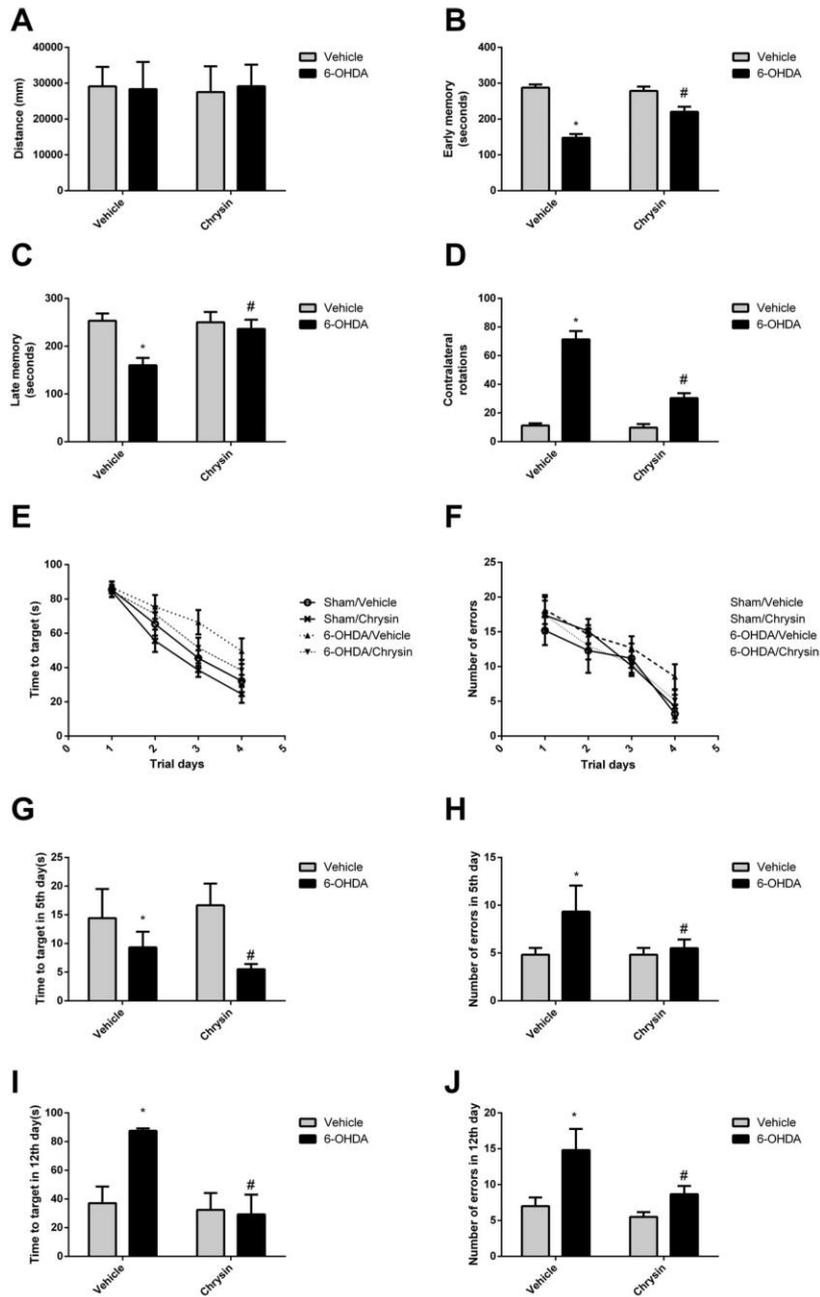


Fig. 2. Effect of chrysin (10 mg/kg, i.g.) and/or 6-OHDA on (A) distance traveled in open field, (B) early and (C) late memory in passive avoidance test and (D) contralateral rotation test in mice ($n = 5$ mice/group). It is also shown the effect of chrysin and 6-OHDA on Barnes maze test ($n = 10$ mice/group). (E) Time to target in trial days, (F) number of errors in trial days, (G) time to target in the 5th day, (H) number of errors in the 5th day, (I) time to target in the 12th day, (J) number of errors in the 12th day. * $P < 0.05$ when compared with Vehicle/Vehicle. # $P < 0.05$ when compared with 6-OHDA/Vehicle.

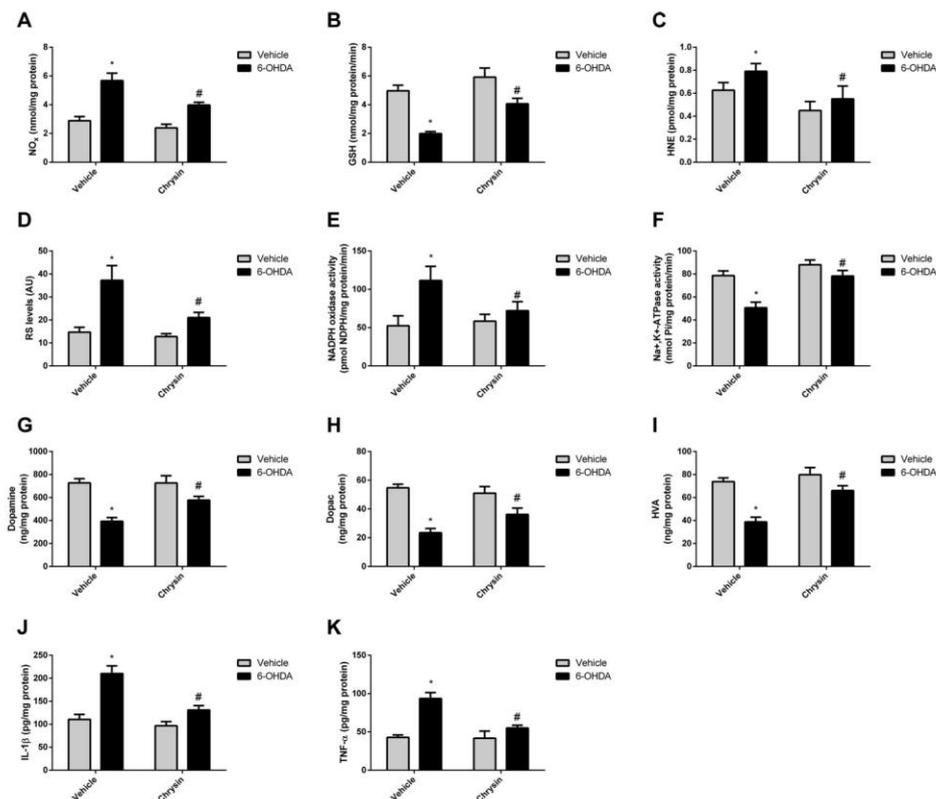


Fig. 3. Effect of treatment chrysin and 6-OHDA on (A) NO_x, (B) GSH, (C) HNE and (D) RS levels (n = 5 mice/group) as well as (E) NADPH oxidase and (F) Na⁺, K⁺-ATPase activities (n = 5 mice/group). It is also shown the effect of chrysin and 6-OHDA on (G) Dopamine, (H) DOPAC, (I) HVA, (J) IL-1 β and (K) TNF- α levels (n = 4 mice/group). The values were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test and expressed as the mean \pm SEM. * P < 0.05 when compared with Vehicle/Vehicle. # P < 0.05 when compared with 6-OHDA/Vehicle.

HVA levels induced by 6-OHDA. Goes et al. [13] reported similar protective effects of the treatment of chrysin in male C57B/6J adult mice, reinforcing the relationship between protective effects of chrysin and dopamine metabolism pathway in the PD model induced by 6-OHDA.

The significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta results in the development of PD-like behavioral symptoms such as tremor, rigidity and bradykinesia [2]. However, it is also recognized that PD patients often suffer from non-motor symptoms, such as autonomic dysfunction and cognitive deterioration [5]. We found that systemic chrysin treatment attenuated the contralateral rotation and cognitive deterioration in Barnes maze and passive avoidance test (spatial learning deficits and memory early/late deficits). In addition, age-related memory decline was partially protected by chrysin at a dose of 1 mg/kg, and normalized at the dose of 10 mg/kg [24]. Using a similar treatment, Goes et al. [13] reported that the chrysin attenuated apomorphine-induced rotations (dyskinesia) in mice. Taken together, these data suggest that chrysin can prevent age-related decline in memory and motor decline. Regarding this point, our current neurochemical results indicate that some of the mechanisms underlying beneficial effects of chrysin include antioxidant and anti-inflammatory effects.

Nitric oxide (NO) has many physiological roles in the nervous

system. However, in pathological conditions like PD, it could contribute to the oxidative stress and neurodegeneration [4,16]. For instance, excess of NO contributes to death of dopaminergic neurons and eventually development of PD symptoms [16]. In this context, here we showed an increase in NO synthesis concomitantly to increased RS generation and HNE levels (an index of lipid peroxidation) in 6-OHDA-treated mice. Moreover, decreased GSH levels and increased NADPH oxidase activity further indicate favorable conditions to occurrence of oxidative stress after 6-OHDA injection. This is particularly interesting considering that GSH is a major antioxidant defense and NADPH oxidase is a RS-generating enzyme which produce a large amounts of RS in the brain of a PD model and plays a key role in dopaminergic neurodegeneration in PD [26]. Importantly, chrysin prevented all the oxidative stress-related changes induced by 6-OHDA injection in aged female mice, supporting the idea that an important mechanism underlying its beneficial effects in 6-OHDA model of PD is improvement of redox balance. In line with this view, it is remarkable to note that chrysin demonstrated similar antioxidant effects in models of age-related cognitive decline [24] and chronic unpredictable mild stress [12].

Considering the potential targets of oxidative stress, Na⁺, K⁺-ATPase seems one of major importance, since its activity is susceptible to RS, lipid peroxidation products, and oxidation of sulfhydryl groups [7]. In the present study chrysin prevented Na⁺, K⁺-ATPase activity

decrease elicited by 6-OHDA. Since Na^+ , K^+ -ATPase is responsible for the maintenance of several cellular ionic gradients, playing a fundamental role in neuronal excitability and signaling [1], chrysin-mediated protection of Na^+ , K^+ -ATPase activity may represent a potential mechanism underlying its beneficial effects on behavioral and cognitive tests. To some extent, our results agree with those by Khadrawy et al. who have reported that caffeine ameliorated oxidative stress and impairment of Na^+ , K^+ -ATPase activity in model of PD induced by rotenone [17].

In addition to oxidative stress, chronic inflammation is associated with a broad spectrum of age-related neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis and PD [20]. For instance, inflammatory responses like microglia activation and accumulation of inflammatory mediators in striatum play a role in the progression of PD [49]. In fact, pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β induce neuronal damage, and therefore suppression of their signaling is important in the treatment of neurodegenerative diseases [20]. Accordingly, our present results agree with this view, since chrysin blunted the 6-OHDA-elicited increase of TNF- α and IL-1 β in striatum of aged-mice. Indeed, these results support the efficacy of chrysin against neuroinflammation, as demonstrated using *in vitro* [18] and *in vivo* models [13].

5. Conclusion

In the present study, chrysin was beneficial against behavioral, cognitive and neurochemical changes in a PD model induced by 6-OHDA in aged female mice. Mechanisms underlying chrysin effects include decrease of oxidative stress and neuroinflammation, which eventually attenuates behavioral and cognitive impairments.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgement

Work supported by Fundação de apoio à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) [#16/2551-0000526-5] (PRONUPEQ), [#16/2251-0000183-9] (ARD/PPP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

References

- [1] A. Aperia, New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target, *J. Intern. Med.* 261 (2007) 44–52.
- [2] B. Becker, M. Demirbas, S. Johann, A. Zendedel, C. Beyer, H. Clusmann, S.J. Haas, A. Wree, S.K.H. Tan, M. Kipp, Effect of intrastriatal 6-OHDA lesions on extrastriatal brain structures in the mouse, *Mol. Neurobiol.* 55 (2018) 4240–4252.
- [3] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [4] B. Brune, Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* 10 (2003) 864–869.
- [5] K.R. Chaudhuri, A.H. Schapira, Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment, *Lancet Neurol.* 8 (2009) 464–474.
- [6] O.P. Dall'Igna, P. Fett, M.W. Gomes, D.O. Souza, R.A. Cunha, D.R. Lara, Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice, *Exp. Neurol.* 203 (2007) 241–245.
- [7] D. Dobrota, M. Matejovicova, E.G. Kurella, A.A. Boldyrev, Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury, *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 141–149.
- [8] F. Donato, M.G. de Gomes, A.T. Goes, C.B. Filho, L. Del Fabbro, M.S. Antunes, L.C. Souza, S.P. Boeira, C.R. Jesse, Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: possible role of l-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels, *Brain Res. Bull.* 104 (2014) 19–26.
- [9] J. Drouin-Ouellet, M. LeBel, M. Fillali, F. Cicchetti, MyD88 deficiency results in both cognitive and motor impairments in mice, *Brain Behav. Immun.* 26 (2012) 880–885.
- [10] A.C. Ferraz, F. Matheussi, R.E. Szawka, V. Rizelio, A.M. Delattre, P. Rigon, E. Hermel Edo, L.L. Xavier, M. Achaval, J.A. Anselmo-Franci, Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-hydroxydopamine injection into the substantia nigra pars compacta or the medial fore-brain bundle, *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1238–1246.
- [11] A.P. Ferreira, F.S. Rodrigues, I.D. Della-Pace, B.C. Mota, S.M. Oliveira, C. Velho, et al., The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage, *Neurochem. Int.* 63 (2013) 583–593.
- [12] C.B. Filho, C.R. Jesse, F. Donato, R. Giacomelli, L. Del Fabbro, M. da Silva Antunes, M.G. de Gomes, A.T. Goes, S.P. Boeira, M. Prigol, L.C. Souza, Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na(+),K(+)-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin, *Neuroscience* 289 (2015) 367–380.
- [13] A.T.R. Goes, C.R. Jesse, M.S. Antunes, F.V. Lobo Ladd, A.A.B. Lobo Ladd, C. Luchese, N. Paroul, S.P. Boeira, Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: involvement of neuroinflammation and neurotrophins, *Chem. Biol. Interact.* 279 (2018) 111–120.
- [14] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226.
- [15] T.M. Kaariainen, M. Lehtonen, M.M. Forsberg, J. Savolainen, M. Kaenmaki, P.T. Mannisto, Comparison of the effects of deramciclane, ritanserin and buspirone on extracellular dopamine and its metabolites in striatum and nucleus accumbens of freely moving rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102 (2008) 50–58.
- [16] R. Kavya, R. Saluja, S. Singh, M. Dikshit, Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease, Nitric oxide: biology and chemistry 15 (2006) 280–294.
- [17] Y.A. Khadrawy, A.M. Salem, K.A. El-Shamy, E.K. Ahmed, N.N. Fadl, E.N. Hosny, Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of parkinson's disease induced by rotenone, *J. Diet. Suppl.* 14 (2017) 553–572.
- [18] B.K. Lee, W.J. Lee, Y.S. Jung, Chrysin attenuates VCAM-1 expression and monocyte adhesion in lipopolysaccharide-stimulated brain endothelial cells by preventing NF-kappaB signaling, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017).
- [19] S. Li, X.P. Pu, Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1291–1296.
- [20] P.L. McGeer, E.G. McGeer, Inflammation and the degenerative diseases of aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035 (2004) 104–116.
- [21] L.D. Mercer, B.L. Kelly, M.K. Horne, P.M. Beart, Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 339–345.
- [22] A.J. Noyce, J.P. Bestwick, L. Silveira-Moriyama, C.H. Hawkes, G. Giovannoni, A.J. Lees, A. Schrag, Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease, *Ann. Neurol.* 72 (2012) 893–901.
- [23] P. Song, S. Li, H. Wu, R. Gao, G. Rao, D. Wang, Z. Chen, B. Ma, H. Wang, N. Sui, H. Deng, Z. Zhang, T. Tang, Z. Tan, Z. Han, T. Lu, Y. Zhu, Q. Chen, Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Protein Cell* 7 (2016) 114–129.
- [24] L.C. Souza, M.S. Antunes, C.B. Filho, L. Del Fabbro, M.G. de Gomes, A.T. Goes, F. Donato, M. Prigol, S.P. Boeira, C.R. Jesse, Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134 (2015) 22–30.
- [25] S. Vivekanantham, S. Shah, R. Dewji, A. Dewji, C. Khatri, R. Ologunde, Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair, *Int. J. Neurosci.* 125 (2015) 717–725.
- [26] Y. Zhou, M. Li, D.L. Zhu, T. Jiang, Q. Gao, X.H. Tang, S.G. Zhang, J. Lu, Y.D. Zhang, Neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) against rotenone-induced oxidative damage in CATH.a neurons, *Toxicol. In Vitro* 50 (2018) 373–382.

3.2. Artigo 2

Crisina suprime as respostas imunes e protege contra encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Lucian Del Fabbro, Marcelo Gomes de Gomes, Leandro Cattelan Souza, André Rossito Goes, Silvana Peterini Boeira, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Cristiano Ricardo Jesse

Journal of Neuroimmunology, Volume 335, 15 de outubro, 577007.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Chrysin suppress immune responses and protects from experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

Lucian Del Fabbro^a, Marcelo Gomes de Gomes^{a,b}, Leandro Cattelan Souza^a, André Rossito Goes^a, Silvana Peterini Boeira^a, Mauro Schneider Oliveira^c, Ana Flávia Furian^{d,*}, Cristiano Ricardo Jesse^a

^a Universidade Federal do Pampa, Laboratory of Pharmacological and Toxicological Evaluations Applied to Bioactive Molecules (Lafambio Pampa), Campus Itaquí, 97650-000 Itaquí, RS, Brazil

^b Universidade Federal do Pampa, Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Campus Uruguaiana, 97501-970 Uruguaiana, RS, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Maria, Laboratory of Neurotoxicity and Psychopharmacology (LABNEURO), Santa Maria, RS, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Maria, Laboratory of Pharmacology, Mycotoxins and Toxicology (LAFARMT), Santa Maria, RS, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Multiple sclerosis
Central nervous system
Neurodegenerative
Nutraceutical

ABSTRACT

We investigated the effects of chrysin in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a multiple sclerosis (MS) animal model. EAE was induced using myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35–55 peptide in C57BL/6 mice. Chrysin reduced weight loss, attenuated clinical signs and blunted the EAE-induced increase in histone deacetylase (HDCA) activity, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) levels and pro-inflammatory cytokine levels as well as in the EAE-induced decrease in histone acetyltransferases 3 and 4 (HAT3, HAT4). Altogether, results demonstrate beneficial effects and potential targets of chrysin in EAE.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common chronic inflammatory demyelinating neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) (Zhang et al., 2015a,b). MS causes varying degrees of relapsing or progressive neurological impairments (Zhang et al., 2015a,b). The clinical course and disease progression of MS are highly variable and likely depend on complex heritable (genetic and epigenetic) and environmental factors (Kucukali et al., 2015). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS, which is often used for studies of the pathogenesis and therapeutic interventions for this disease (Zhang et al., 2015a,b).

Several immunomodulatory drugs have been introduced to treat MS, but current drugs are unsatisfactory because their limited efficacy and occurrence of severe toxicity in some patients (Ge et al., 2013). In recent years, there has been increasing interest in seeking alternative and complementary means to improve the outcomes of conventional therapies in MS patients (Wang et al., 2018). Regarding this point, the use of flavonoids may be considered an interesting strategy, since pre-clinical data indicate that flavonoids can reduce neuroinflammation

through regulation of microglial cells (Spagnuolo et al., 2018). Moreover, flavonoids have received considerable attention as a dietary supplement since they modulate the immune and inflammatory responses (Kanwal et al., 2016; Wang et al., 2018). In this context, chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a natural flavonoid present in many plant extracts, flowers, honey and propolis (Borges et al., 2015).

Chrysin has several of pharmacological activities, such as anti-inflammatory, hipolipidemic, antioxidant, antidepressant (Borges et al., 2015; Souza et al., 2015; Zarzecki et al., 2014). For instance, Goes et al. (2018) reported that chrysin protected against behavioral alterations and neuroinflammation in a mouse model of the Parkinson's disease (PD) induced by 6-OHDA. Moreover, Zhang et al. (2015a,b) showed that chrysin inhibited human dendritic cell differentiation, maturation and function in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS. Importantly, chrysin modulates DNA and histone methylation (Kanwal et al., 2016), and an increasing number of studies have shown that histone deacetylase (HDAC) inhibitors have beneficial effects on autoimmune and inflammatory diseases (Ge et al., 2013). Therefore, the present study aimed to further explore the beneficial effects of chrysin on MS (EAE model), as well as potential underlying

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; HDAC, histone deacetylase; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; HAT3, HAT4, histones acetyltransferases 3 and 4; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; CNS, central nervous system

* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacology, Mycotoxins and Toxicology (LAFARMT), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 43, Sala 4217, CEP - 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

E-mail address: ana.furian@ufsm.br (A.F. Furian).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577007>

Received 20 March 2019; Received in revised form 24 June 2019; Accepted 15 July 2019
0165-5728/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

mechanisms such as GSK-3 β , HDAC, HATs and interleukins on spleen, spinal cords, hippocampus and prefrontal cortex.

2. Material and methods

2.1. Animals and chemicals

Male C57BL/6 mice (20–25 g) in weight and adults (90 days old) were used. Animals were housed, divided in groups of 6 in Plexiglas cages (41 cm \times 34 cm \times 16 cm) with the floor covered with sawdust. They were kept in a room with light-dark cycle of 12 h with the lights on between 7:00 and 19:00 h and temperature controlled (20–25 °C) and received water and food ad libitum. The experimental protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Pampa (# 034/2017) and conducted in accordance with national (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and international (U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) legislation.

Chrysin and other reagents used in this experiment were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Treatment

Mice were fed diet AIN-93 M (Puro Trato, RS), ad libitum. After one week of acclimation, mice were randomly divided into 4 groups: Naïve/vehicle (group 1), Naïve/Chrysin (group 2), EAE/vehicle (group 3) and EAE/Chrysin (group 4).

Chrysin (20 mg/kg) was dissolved in a saline/propylene glycol solution (80:20), and was administered intragastrically (i.g.) for 25 days (Borges et al., 2015), right after immunized to induce EAE as described below.

2.3. Induction, and clinical assessment of EAE

To induce EAE (Fig. 1), mice were immunized subcutaneously in the both flanks with 100 μ g myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35–55 peptide, and purity > 95% (Sigma, St. Louis, USA), dissolved in 200 μ l of PBS and emulsified in 100 μ l of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma, St. Louis, USA) containing 200 μ g of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, USA). Immediately after immunization and again 48 h later, the mice were received a tail vein injection of 200 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, CA, USA) in 100 μ l of PBS (Zhang et al., 2017). The naive group received PBS

instead of MOG35–55 peptide. The experimental protocol was repeated two times to ensure the reproducibility of the results.

2.4. Mean clinical score

The mean clinical scores (MCSs) were assessed daily according to a standard scoring system. The disease was graded on a scale of 0–5 of increasing severity: 0, no clinical signs; 1, tail paralysis; 2, one hindlimb paralysis; 3, complete hindlimb paralysis; 4, hindlimb and forelimb paralysis; 5, moribund/death. (Zhang et al., 2015a,b). Results are shown as average daily scores and area under curve (AUC).

2.5. Tissue preparation

After the mean clinical score evaluation, animals were euthanized, the spleen, spinal cords (SC), hippocampus (HIP), prefrontal cortex (PFC) were dissected, removed, weighed and homogenized in 50 mM Tris-Cl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2400 \times g for 15 min at 4 °C, and a low-speed, supernatant fraction (S1) was used for assays.

2.6. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)

The measurement of GSK-3 β level was performed using a commercially available ELISA kit (YH Biosearch Laboratory, Shanghai, China), according to the manufacturer's instructions. All samples had their total protein levels adjusted to 1 mg/ml before starting ELISA procedures.

2.7. TNF, IL-17 and IFN γ

Levels of TNF, IL-17 and IFN γ in the spleen, SC, PFC, HP were determined using commercially available ELISA assays, following the instructions supplied by the manufacturer (DuoSet Kits, R&D Systems; Minneapolis). Results are shown as pg/mg tissue.

2.8. Histone deacetylase (HDAC) and histone acetyltransferases 3 and 4 (HATs)

The level of global HDAC and HATs 3 and 4 was estimated by using EpiQuik™ Global HDAC and HAT3 and HAT4 Assay Kit (as per manufacturer's instruction).

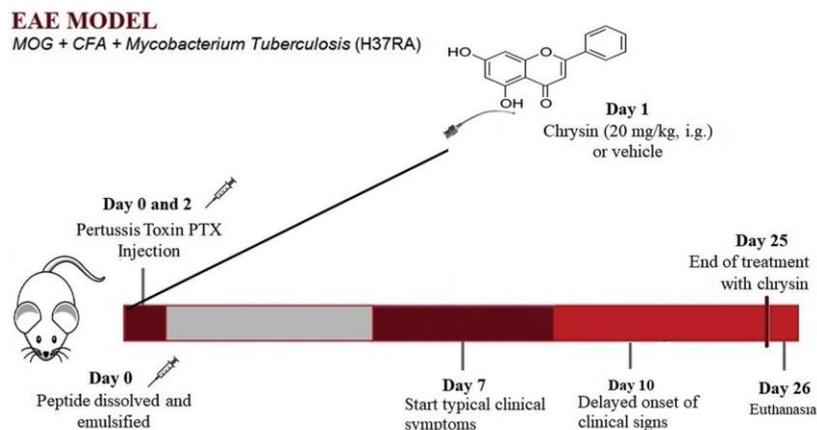


Fig. 1. Overview of study design.

2.9. Protein determination

Protein concentration was measured by the Bradford (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (1 mg/ml) as the standard (Sigma). The Bradford assay is a protein determination method that involves the binding of Coomassie Brilliant Blue G-250 to proteins. It is this blue protein form that is detected at 595 nm in the assay using a microplate reader.

2.10. Statistical analysis

Results are presented as mean and S.E.M. Comparisons between the experimental and control group were performed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. All tests were carried out using the GraphPad software (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Chrysin treatment attenuates the clinical signs and body weight loss caused by EAE

Typical clinical signs, such as tail atony and clumsy gait, appeared on day 7 post-MOG-injections and continue to rise until day 25 on untreated EAE group (Fig. 2A). Statistical analyses showed that control group differed from EAE in day 10 until day 26. In days 10, 11, 13, 15–26 EAE differed from chrysin and from chrysin-treated EAE (Fig. 2A and B). Chrysin-treated EAE afforded a 55% improvement in clinical scores, as measured by the area under the curve (AUC) (Fig. 2B). Moreover, a progressive body weight loss paralleled disease severity in a mice model of EAE (Fig. 2C). In addition, chrysin treatment protected against marked loss of body weight induced by EAE (Fig. 2C).

3.2. Chrysin treatment modulates levels of GSK3 β

EAE increased GSK3 β levels in spleen, SC HIP and PFC and chrysin treatment (20 mg/kg) partially protected against this increase (Fig. 3A–D).

3.3. The EAE model induced desbalance of HAT/HDAC in the spleen, HIP, PFC and SC of mice

Activation and/or overexpression of specific HDACs have been associated with neurodegenerative diseases, so in this study we investigate the role of HDACs in a model of MS. In response to EAE model, a significant increase in HDAC activity was found in the spleen, HIP, PFC and SC when compared to naïve/vehicle group (Table 1). In contrast, HDAC activity in naïve/chrysin group significantly decreased compared to control mice (naïve/vehicle), supporting a chrysin-induced inhibition of HDAC activity. Post hoc comparison showed that chrysin treatment normalized the increased HDAC activity observed in

the spleen, HIP, PFC and SC of EAE/vehicle mice (Table 1).

EAE/Vehicle demonstrated a significant inhibition of HAT H3 and H4 activities in the spleen, HIP, PFC and SC when compared to control group (naïve/vehicle) (Table 1). However, chrysin treatment increased the HAT H3 and H4 activities in the spleen, HIP, PFC and SC compared to naïve/vehicle group, demonstrating a modulatory effect. Post hoc comparisons indicated that the inhibition of HAT H3 and H4 activities in the spleen, HIP, PFC and SC of EAE/Vehicle mice was mitigated by chrysin treatment (Table 1).

3.4. Cytokines levels in the spleen, HIP, PFC and SC of mice

The levels of IFN γ , IL-17 and TNF levels were analyzed in the spleen, HIP, PFC and SC (Table 2). EAE/vehicle group increases the levels of IFN γ , IL-17 and TNF compared to the naïve/vehicle group. Chrysin treatment reduces the increased inflammatory cytokines observed in the spleen, HIP, PFC and SC of EAE/vehicle mice (Table 2).

4. Discussion

In this study, we explored the effects of flavonoid chrysin on EAE model of MS. Chrysin attenuated mean clinical score, mitigated EAE-induced increases in HDCA activity, GSK-3 β , IFN γ , IL-17 and TNF levels as well as EAE-induced decrease in HAT3 and HAT4 activities.

One of the first hallmarks of disease in the MOG-induced EAE model is a reduction of body weight and onset of signs such as tail tonus and hind limb paralysis (Giacoppo et al., 2015). As expected, mice belonging to EAE/vehicle group significantly lost weight and showed the highest score of disease (about 5 points in the grading scale of disease), in accordance with previous studies by Giacoppo et al. (2015), Khezri et al. (2018) and Mahmoodi et al. (2019). Mice treatment with chrysin at the dose of 20 mg/kg afforded significant protection against disease induction, delayed onset of clinical signs and attenuated clinical scores compared with the vehicle-treated counterparts.

The neuroprotective and immunosuppressive effects of histone deacetylase inhibitors (HDACi) suggest that HDACi may potentially be useful for treatment of neuroinflammatory diseases including MS. Recent studies using HDACi trichostatin A (TSA) and valproic acid, as well as Vorinostat (which preferentially inhibits class I and HDAC6, although it is not highly selective), have been shown to ameliorate EAE (Camelo et al., 2005; Ge et al., 2013; Sun et al., 2018; Zhang et al., 2012). In the present study chrysin modulated HDAC activity by blocking increased activity in EAE-treated mice. Inhibition of HDACs by chrysin was previously reported in vitro by Pal-Bhadra et al. (2012) and Kanwal et al. (2016). Importantly, here we show for the first time that such inhibition of HDAC by chrysin also occurs in vivo, which is agreement with the fact that HDAC inhibitors have been shown to have good prophylactic effects in rodent EAE model (Camelo et al., 2005; Ge et al., 2013). HDAC inhibitors and their derivatives have attracted attention as potent neuroprotective drugs (Leng et al., 2010) that trigger beneficial effects in EAE and could be useful in the treatment of

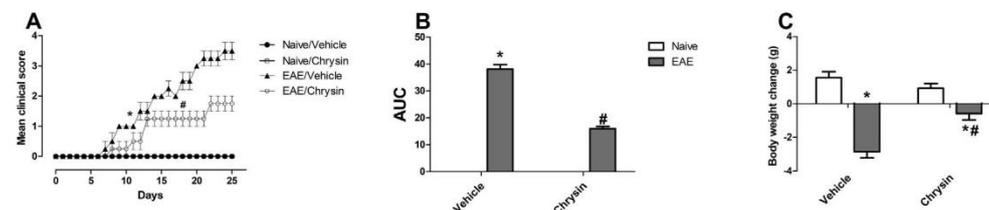


Fig. 2. Effect of treatment chrysin and MOG₃₅₋₅₅/CFa on the clinical scores (A), area under curve (AUC) and body weight changes (C) in mice in a model of EAE. (Values are means and S.E.M. ($n = 6$)). * $P < 0.05$ when compared with naïve/vehicle; # $P < 0.05$ when compared with EAE/vehicle (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

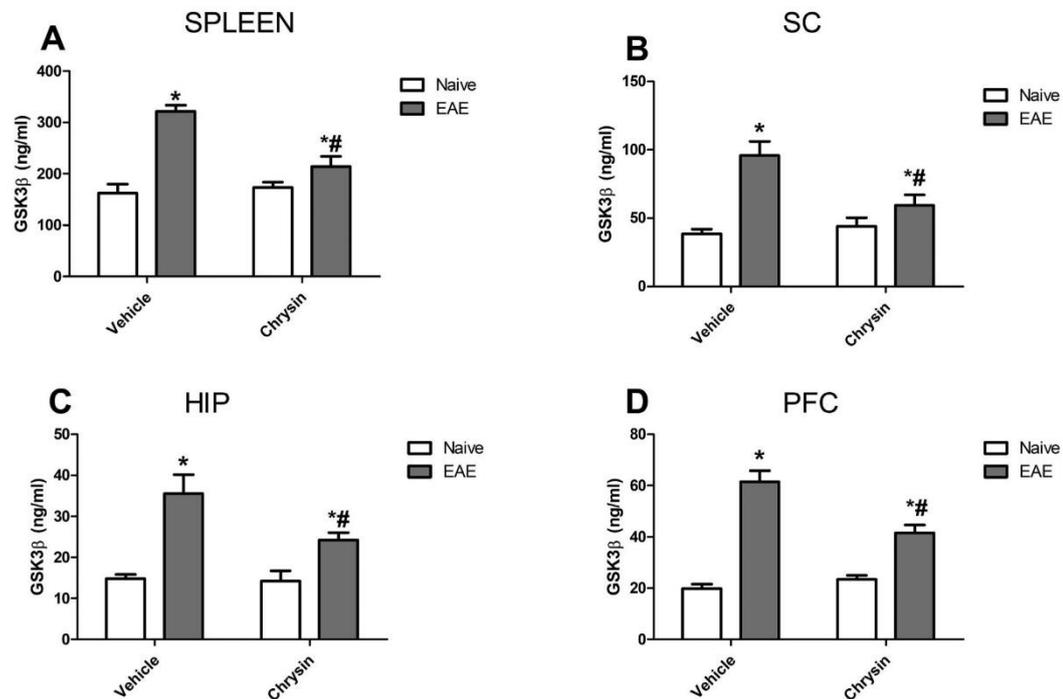


Fig. 3. Effect of treatment chrysin and MOG_{35–55}/CFA on the GSK3 β levels in the SPLEEN (A), SC (B), HIP (C) and PFC (D) (Values are means and S.E.M. (n = 6). * $P < 0.05$ when compared with Naïve/vehicle; # $P < 0.05$ when compared with EAE/vehicle (Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test).

autoimmune demyelination (Wang et al., 2015a,b; Azuchi et al., 2017). Understanding the involvement of particular HDACs may help to develop selectively acting medication and reduce unwanted side effects (Wang et al., 2018). Many genes are associated with the development of neurodegenerative diseases, and are susceptible to changes in expression by epigenetic mechanisms. (Neal and Richardson, 2018). The epigenetic regulation, through your components, may critically affect

immune system activation, neurogenesis and myelin formation in MS (Castelo-Branco et al., 2014). HDAC2 is a histone deacetylase that has been shown to reduce the acetylation of learning and memory-related genes (Gräff et al., 2012), besides that selected human studies identified changes in specific histone marks or changes in the levels of the enzymes that are involved in these posttranslational modifications in specific regions of AD postmortem brains (Ding et al., 2008).

Table 1

Effect of treatment chrysin and EAE on HDAC, HAT 3 and HAT 4 activities in the spleen, HIP, PFC and SC of mice.

	Naive		EAE	
	Vehicle	Chrysin	Vehicle	Chrysin
HDAC				
Spleen	5615 \pm 321.1	5141 \pm 295.5*	7281 \pm 198.1*	4812.2 \pm 177.9 [#]
HIP	2532 \pm 233.6	1887 \pm 179.1*	3774 \pm 312.5*	2150 \pm 119.2 [#]
PFC	2612 \pm 221.1	1949 \pm 244.3*	4208 \pm 150.3*	2331 \pm 224.1 [#]
SC	5478 \pm 410.2	4179 \pm 314.1*	7171 \pm 421.3*	4518 \pm 229.0 [#]
HAT 3				
Spleen	473.2 \pm 52.7	606.5 \pm 53.7 [#]	279.2 \pm 11.7 [#]	504.2 \pm 22.5 [#]
HIP	119.5 \pm 10.1	168.2 \pm 8.90 [#]	84.5 \pm 8.70 [#]	125.1 \pm 8.50 [#]
PFC	126.0 \pm 6.33	172.1 \pm 12.1 [#]	82.5 \pm 4.56 [#]	136.1 \pm 6.20 [#]
SC	244.2 \pm 21.6	353.7 \pm 22.6 [#]	157.2 \pm 15.3 [#]	216.5 \pm 13.9 [#]
HAT 4				
Spleen	294.2 \pm 15.8	463.7 \pm 20.6 [#]	197.0 \pm 7.10 [#]	261.5 \pm 24.3 [#]
HIP	89.2 \pm 8.10	146.2 \pm 8.90 [#]	59.5 \pm 4.90 [#]	92.7 \pm 9.60 [#]
PFC	90.2 \pm 7.60	128.5 \pm 4.50 [#]	65.2 \pm 5.30 [#]	95.7 \pm 7.60 [#]
SC	339.5 \pm 22.5	489.7 \pm 44.0 [#]	212.7 \pm 32.0 [#]	354.5 \pm 38.2 [#]

The values were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (n = 6).

* $P < 0.05$ when compared with Naïve/vehicle.

$P < 0.05$ when compared with EAE/vehicle.

Table 2
Effect of treatment chrysin and EAE on pro-inflammatory cytokines levels in the spleen, HIP, PFC and SC of mice.

	Naive		EAE	
	Vehicle	Chrysin	Vehicle	Chrysin
IFNγ				
Spleen	1569 \pm 152.9	1539 \pm 205.7	4961 \pm 412.1 ^a	2778 \pm 189.1 ^{a#}
HIP	578.1 \pm 41.2	548.5 \pm 46.8	957.8 \pm 75.8 ^a	729.5 \pm 34.6 ^{a#}
PFC	601.4 \pm 38.2	494.8 \pm 27.9 ^a	1045 \pm 53.3 ^a	753.0 \pm 70.6 ^{a#}
SC	377.8 \pm 36.2	371.8 \pm 28.4	813.5 \pm 48.4 ^a	425.0 \pm 61.0 ^{a#}
IL-17				
Spleen	1025 \pm 82.7	861.5 \pm 77.5 ^a	1764 \pm 139.9 ^a	1299 \pm 55.1 ^{a#}
HIP	242.3 \pm 23.5	186.3 \pm 18.9	424.8 \pm 17.8 ^a	341.3 \pm 22.1 ^{a#}
PFC	178.8 \pm 13.6	169.9 \pm 10.3	409.8 \pm 32.9 ^a	224.1 \pm 19.7 ^{a#}
SC	336.3 \pm 33.2	325.1 \pm 30.7	849.5 \pm 29.8 ^a	527.5 \pm 25.3 ^{a#}
TNF				
Spleen	2774 \pm 162.3	2192 \pm 87.9 ^a	3753 \pm 156.6 ^a	2947 \pm 138.6 ^{a#}
HIP	171.3 \pm 12.4	155.32 \pm 11.2	427.0 \pm 32.7 ^a	237.0 \pm 26.3 ^{a#}
PFC	172.0 \pm 20.4	179.3 \pm 10.4	512.0 \pm 59.1 ^a	353.0 \pm 19.2 ^{a#}
SC	270.1 \pm 25.7	241.3 \pm 14.8	769.3 \pm 70.1 ^a	398.6 \pm 52.2 ^{a#}

The values were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (n = 6).

^a P < 0.05 when compared with Naive/vehicle.

[#] P < 0.05 when compared with EAE/vehicle.

Recent studies suggest the potential advantages of combined treatment of GSK-3 β and HDAC inhibition in various in vitro and in vivo models of neurological diseases (Sharma and Taliyan, 2015). GSK-3 β is a multifunctional protein kinase that phosphorylates several brain proteins, including neurofilaments (Nicolia et al., 2017). It is an important proinflammatory molecule in autoimmune CNS diseases (Beurel, 2011), being involved in differentiation of Th17 cells, which is important for the induction of EAE in mice and plays an important role in neurodegeneration (Beurel et al., 2013). Thus, the blockade of GSK-3 signaling may be a therapeutic strategy for neuroprotection (Ahn et al., 2017). HDACs are the enzymes which remove acetyl groups from lysine residues in proteins and play pivotal roles in epigenetic regulation of gene transcription by remodeling chromatin structure. Activation and/or overexpression of specific HDACs have been associated with neurodegenerative diseases (Bardai and D'Mello, 2015). In the present study chrysin treatment reduced GSK-3 β levels EAE/Chrysin group and inhibited the activity of HDAC, agreeing with the scenario described by Bardai and D'Mello (2015), who proposed a possible link between GSK-3 β and histone deacetylases (HDACs). Moreover, Ryves et al. (2005) reported that lithium chloride (LiCl), a well-known mood stabilizer, possibly act via inhibition of GSK-3 β and HDAC. In addition, Valproic acid (VPA) is an HDAC and GSK-3 β inhibitor and has been widely clinically used as a pharmacological agent in the treatment of epilepsy, bipolar disorder, spinal muscular atrophy and migraine headaches for nearly 50 years (Cho et al., 2012; Wang et al., 2015a,b). These lines of evidence clearly point toward a possible link between GSK-3 β and HDAC in neurodegenerative processes involved in neuroinflammation. Regarding this point, simultaneous attenuation of HDAC and GSK-3 β may also explain the presently-reported beneficial effects of chrysin in the EAE model.

Proper histone acetylation homeostasis is maintained by the antagonistic activity of histone acetyltransferases (HATs) and HDACs that activate and repress gene expression, respectively (Panikker et al., 2018). In the present study chrysin treatment up-regulated HAT3 and HAT4, enzymes with opposite function to HDAC and that are decreased during neurodegeneration (Schmalbach and Petri, 2010). Once the balance is disturbed and the HAT/HDAC ratio shifts in favor of HDAC in terms of availability and enzymatic functionality, an altered transcription profile is observed, typically represented by the repression of pro-survival molecules and the decrease of several pro-apoptotic gene products. Thus, in the use of HDAC inhibitors has been considered a

potential and attractive therapeutic approach (Garbes et al., 2013). Beyond chrysin, others bioactive compounds could also regulate HATs and HDACs. Priyadarsini et al. (2011) reported that quercetin inhibits the expression of TNF, IFN- γ and macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and post-translational modifications (acetylation and phosphorylation) of HAT3. In line of this view, other flavonoids are also investigated in EAE model. Ciftci et al. (2015) demonstrated hesperidin treatment prevents the oxidative stress caused by EAE in mice via a decrease in lipid peroxidation and increase in elements of the antioxidant defense systems in brain tissue. Wang et al. (2016) investigated the beneficial effects of resveratrol in protecting the integrity of the BBB in EAE mice and observed improved clinical outcome after resveratrol treatment. Additionally, Haghmorad et al. (2017) demonstrated that hesperidin inhibited development of EAE in mice. Xie et al. (2018) demonstrated kurarinone significantly inhibits the clinical progression of EAE through the inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and proliferation.

Dysregulation of the immune system in EAE/MS is a fundamental aspect of both initiation and progression of disease. CD4⁺ T cell-mediated autoimmunity is widely regarded as one of the most important aspects of MS pathogenesis (Zhang et al., 2015a,b). The immune response in MS is generally considered to be shifted toward T helper type 1 (Th1) cytokine production, including TNF and IFN γ (Kleinewietfeld and Hafler, 2014; Zhang et al., 2014). However, recent studies have indicated that IL-17 producing Th17 cells are involved, and are as critical as Th1 cells in this (Kebir et al., 2009). Komiyama et al. (2006) reported mice deficient for IL-17 are protected from the development of EAE. In the present study, chrysin treatment reduces pro-inflammatory cytokines IFN γ , TNF and IL-17 corroborating with the data described by Meng et al. (2017). The Th1 lineage of cytokine can help Th17 cells invade the brain and spinal cord, thus trigger EAE (Reboldi et al., 2009). The high percentage of Th17 cells has an impact on the inflammation in the brain and the severity of disease (Stromnes et al., 2008).

Another feature of EAE is the presence of infiltrating inflammatory cells in SC (Rossato et al., 2017). These infiltrating cells consist primarily of T cells and macrophages. Between these inflammatory cells, the Th1 cells (IFN- γ CD4⁺) have been considered to play an important role in EAE development, principally by producing IFN- γ (Renno et al., 1995). In this sense, infiltrating T cells secrete large amounts of IFN- γ which will activate resident glial cells during EAE (Juedes et al., 2000; Renno et al., 1995). IFN- γ can enhance pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12) via monocytes and macrophages activation. Activated macrophages destroy axonal myelin and secrete countless cytokines, including the TNF, which would perpetuate inflammatory reactions, non-specific and would contribute to tissue damage (Rodrigues et al., 2010).

It's known that cognitive impairment is a significant symptom of multiple sclerosis (MS) affecting up to ~70% of patients (Rao et al., 1991). The hippocampus plays an important role in episodic memory, one of the most frequently affected cognitive disorder in MS (DeLuca et al., 1998; Yanike et al., 2004). Moreover, it has been shown that hippocampal demyelination is common in postmortem of MS brain of patients and that demyelinated hippocampi show decreased expression of neuronal proteins involved in a number of biological processes. (Dutta et al., 2011; Koenig et al., 2014).

The prefrontal cortex is one of the first regions showing changes at the beginning of the disease, where focal lesions, demyelination, and functional alterations were associated to cognitive decline and fatigue (Jehna et al., 2013). Since functional changes and atrophy in the frontal cortex may play a crucial role in MS progression these results may have broad implications for understanding the mechanism of cortical neuronal dysfunction in EAE and MS.

5. Conclusion

Chrysin treatment afforded significant protection against multiple parameters in EAE model of MS. These include clinical scores, levels of pro-inflammatory cytokines, and HDAC, HAT3 and HAT4 activities. Altogether, these results demonstrate beneficial effects and potential targets of chrysin in this model of EAE. Pharmacological and nutraceutical effects of chrysin may be explored in other autoimmune and chronic inflammatory disorders.

Declaration of Competing Interests

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

This work was supported by FAPERGS [#16/2551-0000526-5] (PRONUPEQ) and [#16/2251-0000183-9] (ARD/PPP). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

References

- Ahn, M., Kim, J., Park, C., Cho, J., Jee, Y., Jung, K., Moon, C., Shin, T., 2017. Potential involvement of glycogen synthase kinase (GSK)-3 β in a rat model of multiple sclerosis: evidenced by lithium treatment. *Anat. Cell Biol.* 50 (1), 48–59. <https://doi.org/10.5115/acb.2017.50.1.48>.
- Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Nishigaki, A., Namekata, K., Harada, T., 2017. Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorates optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* 639, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.057>.
- Bardai, F.H., D'Mello, S.R., 2015. Selective toxicity by HDAC3 in neurons: regulation by Akt and GSK3 β . *J. Neurosci.* 31, 1746–1751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.570410.2011>.
- Beurel, E., 2011. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 18. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00018>.
- Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Yeh, W., Song, L., Palomo, V., Michalek, S.M., Woodgett, J.R., Harrington, L.E., Eldar-Finkelman, H., Martinez, A., Jope, R.S., 2013. Regulation of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis by glycogen synthase kinase-3. *J. Immunol.* 190 (10), 5000–5011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203057>.
- Borges, F.C., Jesse, C.R., Donato, F., Giacomelli, R., Del Fabbro, L., Antunes, M., Gomes, M., Goes, A., Boeira, S.P., Prigol, M., Souza, L.C., 2015. Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and NA⁺, K⁺-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. *Neuroscience* 289, 367–380. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.048>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Camelo, S., Iglesias, H.A., Hwang, D., Duoc, B., Ryu, H., Smith, K., Gray, G.S., Imitola, J., Duran, G., Assaf, B., Langley, B., Khoury, S.J., Stephanopoulos, G., Girolami, U.D., Ratan, R.R., Ferrante, R.J., Dangond, F., 2005. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 164, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.02.022>.
- Castelo-Branco, G., Stridh, P., Guerreiro-Cacais, A.O., Adzemovic, M.Z., Falcão, A.M., Marta, M., Berglund, R., Gillett, A., Hamza, K.H., Lassmann, H., Hermanson, O., Jagodic, M., 2014. Acute treatment with valproic acid and l-thyroxine ameliorates clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis and prevents brain pathology in DA rats. *Neurobiol. Dis.* 71, 220–233. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.019>.
- Cho, G.W., Kang, B.Y., Kim, K.S., Kim, S.H., 2012. Effects of valproic acid on the expression of trophic factors in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci. Lett.* 526, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.015>.
- Ciftci, O., Ozcan, C., Kamisli, O., Cetin, A., Basak, N., Aytac, B., 2015. Hesperidin, a Citrus flavonoid, has the ameliorative effects against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in a C57BL/6 mouse model. *Neurochem. Res.* 40 (6), 1111–1120. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1571-8>.
- DeLuca, J., Gaudino, E.A., Diamond, B.J., Christodoulou, C., Engel, R.A., 1998. Acquisition and storage deficits in multiple sclerosis. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 20, 376–390. <https://doi.org/10.1076/j.jcen.20.3.376.819>.
- Ding, H., Dolan, P.J., Johnson, G.V., 2008. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *Neurochem.* 106 (5), 2119–2130. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05564.x>.
- Dutta, R., Chang, A., Doud, M.K., Kidd, G.J., Ribaudou, M.V., Young, E.A., Fox, R.J., Staugaitis, S.M., Trapp, B.D., 2011. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 69, 445–454. <https://doi.org/10.1002/ana.22337>.
- Garbes, L., Riessland, M., Wirth, B., 2013. Histone acetylation as a potential therapeutic target in motor neuron degenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* 19, 5093–5104.
- Ge, Z., Da, Y., Xue, Z., Zhang, K., Zhuang, H., Peng, M., Li, Y., Li, W., Simard, A., Hao, J., Yao, Z., Zhang, R., 2013. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp. Neurol.* 241, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.12.006>.
- Giaccoppo, S., Galuppo, M., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., Mazzon, E., 2015. A new formulation of cannabidiol in cream shows therapeutic effects in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Pharm. Sci.* 25, 48. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0131-8>.
- Goes, A.T.R., Jesse, C.R., Antunes, M.S., Lobo Ladd, F.V., Lobo Ladd, A.A.B., Luchese, C., Paroul, N., Boeira, S.P., 2018. Protective role of Chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chem. Biol. Interact.* 279, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.019>.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J.S., Wang, W.Y., Seo, J., Hennig, K.M., Nieland, T.J., Fass, D.M., Kao, P.F., Kahn, M., Su, S.C., Samiei, A., Joseph, N., Haggarty, S.J., Delalle, I., Tsai, L.H., 2012. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 483 (7388), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature10849>.
- Haghmorad, D., Mahmoudi, M.B., Salehipour, Z., Jalayer, Z., Momtazi Brojeni, A.A., Rastin, M., Kokhaei, P., Mahmoudi, M., 2017. Hesperidin ameliorates immunological outcome and reduces neuroinflammation in the mouse model of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 302, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.11.009>.
- Jehna, M., Langkammer, C., Khalil, M., Fuchs, S., Reishofer, G., Fazekas, F., Ebner, F., Enzinger, C., 2013. An exploratory study on the spatial relationship between regional cortical volume changes and white matter integrity in multiple sclerosis. *Brain Connect.* 3 (3), 255–264. <https://doi.org/10.1089/brain.2012.0108>.
- Juedes, A.E., Hjelmström, P., Bergman, C.M., Neild, A.L., Ruddle, N.H., 2000. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164 (1), 419–426.
- Kanwal, R., Datt, M., Liu, M., Gupta, S., 2016. Dietary flavones as dual Inhibitors of DNA methyltransferases and histone methyltransferases. *PLoS ONE* 11 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162956>.
- Kebr, H., Ifergan, I., Alvarez, J.L., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., Prat, A., 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66 (3), 390–402. <https://doi.org/10.1002/ana.21748>.
- Khezri, S., Meysam, S., Froushani, A., Shahmoradi, M., 2018. Nicotine augments the beneficial effects of mesenchymal stem cell-based therapy in rat model of multiple sclerosis. *Immunol. Investig. J. Mol. Cell. Immunol.* 47, 2. <https://doi.org/10.1080/08820139.2017>.
- Kleineviefeld, M., Hafler, D.A., 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol. Rev.* 259, 231–244. <https://doi.org/10.1111/imr.12169>.
- Koenig, K.A., Sakaie, K.E., Lowe, M.J., Lin, J., Stone, L., Bermel, R.A., Beall, E.B., Rao, S.M., Trapp, B.D., Phillips, M.D., 2014. Hippocampal volume is related to cognitive decline and fornix diffusion measures in multiple sclerosis. *Magn. Reson. Imaging* 32 (4), 354–358. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2013.12.012>.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y., 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177 (11), 566–573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.566>.
- Kucukali, C.S., Kurtuncu, M., Çoban, A.C., Tüzün, E., 2015. Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *NeuroMolecular Med.* 17, 83–96. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8298-6>.
- Leng, Y., Marinova, Z., Reis-Fernandes, M.A., Nau, H., Chuang, D.M., 2010. Potent neuroprotective effects of novel structural derivatives of valproic acid: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Neurosci. Lett.* 476 (3), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.013>.
- Mahmoodi, M., Ayoobi, A., Aghaei, A., Rahmani, M., Taghipour, Z., Hosseini, A., Jafarzadeh, A., Sankian, S., 2019. Beneficial effects of *Thymus vulgaris* extract in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical, histological and cytokine alterations. *Biomed. Pharmacother.* 109, 2100–2108. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.078>.
- Meng, X., Fang, S., Zhang, Z., Wang, Y., You, C., Zhang, J., Yan, H., 2017. Preventive effect of chrysin on experimental autoimmune uveitis triggered by injection of human IRBP peptide 1-20 in mice. *Cell. Mol. Immunol.* 14 (8), 702–711. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.107>.
- Neal, M., Richardson, J., 2018. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1864 (2), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.004>.
- Nicolia, V., Ciraci, V., Cavallaro, A.R., Ferrer, I., Scarpa, S., Fusco, A., 2017. GSK3 β 5'-flanking DNA methylation and expression in Alzheimer's disease patients. *Curr. Alzheimer Res.* 14, 7. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203153325>.
- Pal-Bhadra, M., Ramaiah, M.J., Reddy, T.L., Krishnan, A., Pushpavalli, S.N., Babu, K.S., Tiwari, A.K., Rao, J.M., Yadav, J.S., Bhadra, U., 2012. Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells. *BMC Cancer* 16 (12), 180. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-180>.
- Panikkar, P., Xu, S.J., Zhang, H., Sarthi, J., Beaver, M., Sheth, H., Akhter, S., Elefant, F., 2018. Restoring Tip60 HAT/HDAC2 balance in the neurodegenerative brain relieves epigenetic transcriptional repression and reinstates cognition. *J. Neurosci.* 38 (19), 4569–4583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2840-17.2018>.
- Priyadarshini, R.V., Vinoothini, G., Murugan, R.S., Mankandan, P., Nagini, S., 2011. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr. Cancer* 63, 218–226. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011>.

- 523503.
- Rao, S.M., Leo, G.J., Bernardin, L., Unverzagt, F., 1991 May. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 41 (5), 685–691. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2027484>.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., Sallusto, F., 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10, 514–523. <https://doi.org/10.1038/ni.1716>.
- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J.Y., Owens, T., 1995. TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis: regulation by Th1 cytokines. *J. Immunol.* 154 (2), 944–953.
- Rodrigues, D.H., Vilela, M.C., Barcelos, L.S., Pinho, V., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2010. Absence of PI3Kgamma leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 222, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.02.016>.
- Rossato, C., Brandão, W.N., Castro, S.B.R., de Almeida, D.C., Maranduba, C.M.C., Camara, N.O.S., Peron, J.P.S., Silva, F.S., 2017. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth reduce tissue-infiltrating inflammatory cells improving clinical signs in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biologicals* 49, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.06.007>.
- Ruiz, P.A., Braune, A., Holzwimmer, G., Quintanilla-Fend, L., Haller, D., 2007. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 137, 1208–1215. <https://doi.org/10.1093/jn/137.5.1208>.
- Ryves, J.W., Dalton, F.C., Harwood, A.J., Williams, R.S., 2005. GSK-3 activity in neocortical cells is inhibited by lithium but not carbamazepine or valproic acid. *Bipolar Disord.* 7, 260–265. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2005.00194.x>.
- Schmalbach, S., Petri, S., 2010. Histone deacetylation and motor neuron degeneration. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 279–284.
- Sharma, S., Talyan, R., 2015. Synergistic effects of GSK-3 β and HDAC inhibitors in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388, 337–349. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-1081-2>.
- Souza, L.C., Antunes, M.S., Borges, F.C., Del Fabbro, L., Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Donato, F., Prigol, M., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2015. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.04.010>.
- Spagnuolo, C., Gian, S.M., Russo, L., 2018. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Med. Chem.* 153, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.001>.
- Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D.L., Harris, R.A., Goverman, J.M., 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* 14, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nm1715>.
- Sun, L., Telles, E., Karl, M., Cheng, F., Luetteke, N., Sotomayor, E.M., Miller, R.H., Seto, E., 2018. Loss of HDAC11 ameliorates clinical symptoms in a multiple sclerosis mouse model. *J. Proteome Res.* 17 (1), 55–62. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800039>.
- Wang, L., Liu, Y., Li, S., Long, Z.Y., Wu, Y.M., 2015a. Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 578–585.
- Wang, G., Shi, Y., Jiang, X., Leak, R.K., Hu, X., Wu, Y., Pu, H., Li, W.W., Tang, B., Wang, Y., Gao, Y., Zheng, P., Bennett, M.V., Chen, J., 2015b. HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 β /PTEN/Akt axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (9), 2853–2858. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501441112>.
- Wang, D., Li, S.P., Fu, J.S., Zhang, S., Bai, L., Guo, L., 2016. Resveratrol defends blood-brain barrier integrity in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J. Neurophysiol.* 116 (5), 2173–2179. <https://doi.org/10.1152/jn.00510.2016>.
- Wang, J., Ying, Q., Niu, X., Tang, H., Nikbin, S., Wu, D., 2018. Dietary naringenin supplementation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating autoimmune inflammatory responses in mice. *J. Nutr. Biochem.* 54, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.004>.
- Xie, L., Gong, W., Chen, J., Xie, H.W., Wang, M., Yin, X.P., Wu, W., 2018. He flavonoid kurarinone inhibits clinical progression of EAE through inhibiting Th1 and Th17 cell differentiation and proliferation. *Int. Immunopharmacol.* 62, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.022>.
- Yanike, M., Wirth, S., Suzuki, W.A., 2004. *Neuron* 42, 477–487.
- Zarzecki, M.S., Araujo, S., Bortolotto, V.C., de Paula, M.T., Jesse, C.R., Prigol, M., 2014. Hypolipidemic action of chrysin on triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol. Rep.* 1, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.02.003>.
- Zhang, Z., Zhang, Z.Y., Wu, Y., Schluesener, H.J., 2012. Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Neuroscience* 221, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.013>.
- Zhang, J., Cheng, Y., Cui, W., 2014. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 266, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.019>.
- Zhang, K., Ge, Z., Xue, Z., Huang, W., Mei, M., Zhang, Q., Li, Y., Li, W., Zhang, Z., Zhang, Z., Zhang, L., Wang, H., Cai, J., Yao, Z., Zhang, R., Yurong, D., 2015a. Chrysin suppresses human CD14⁺ monocyte-derived dendritic cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 288, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.08.017>.
- Zhang, R., Tian, A., Wang, J., Shen, X., Qi, G., Tang, Y., 2015b. miR26a modulates Th17/Treg balance in the EAE model of multiple sclerosis by targeting IL6. *NeuroMolecular Med.* 17, 24–34. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8335-5>.
- Zhang, K., Guo, Y., Ge, Z., Zhang, Z., Da, Y., Li, W., Zhang, Z., Xue, Z., Li, Y., Ren, Y., Jia, L., Chan, K.H., Yang, F., Yan, J., Yao, Z., Xu, A., Zhang, R., 2017. Adiponectin suppresses T helper 17 cell differentiation and limits autoimmune CNS inflammation via the SIRT1/PPAR γ /ROR γ t pathway. *Mol. Neurobiol.* 54 (7), 4908–4920. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0036-7>.

4. DISCUSSÃO

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por disfunções progressivas e perda lenta de neurônios. O envolvimento dos sistemas funcionais difere entre os distúrbios e está associado a um amplo espectro de sintomas clínicos. Além da perda neuronal em diferentes regiões anatômicas são descritas características bioquímicas e histopatológicas como o espectro de depósitos proteicos presentes em diversas dessas doenças (Kovacs, 2018). O elevado número de combinações de doenças com características neurodegenerativas implica em um vasto painel de proteínas relacionadas à neurodegeneração juntamente com marcadores que refletem a dinâmica da doença (por exemplo, fatores neuroinflamatórios ou de sinalização) no corpo (Kovacs et al., 2010). Ao longo do tempo, muitas plantas têm sido usadas para o tratamento de problemas mentais. No início, eram principalmente plantas contendo alcalóides; de fato sabe-se que os alcalóides interagem fortemente com os receptores do sistema nervoso central, entretanto nos últimos anos, tem-se dado especial atenção aos flavonóides, que se mostraram eficazes contra muitas patologias neurodegenerativas (Airoldi et al., 2018). Neste contexto o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento com crisina em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas, a DP e a EM. Para isto foi utilizado um modelo experimental crônico da DP que induz toxicidade neuronal dopaminérgica nigrostriatal, o modelo da 6-OHDA em camundongos e a EAE um modelo animal de EM, que é frequentemente usado para estudos da patogênese e intervenções terapêuticas para esta doença. No estudo com a 6-OHDA conseguimos demonstrar efeitos protetores do tratamento com crisina em testes comportamentais e cognitivos, bem como em parâmetros neuroquímicos (estresse oxidativo, neuroinflamação e metabolismo da dopamina) em camundongos fêmeas idosas. Já no modelo da EAE o tratamento com crisina atenuou o escore clínico médio da doença, mitigou o aumento da atividade de HDCA e da GSK-3 β induzidos pela EAE, bem como reestabeleceu a atividade de HAT3 e HAT4, além disso protegeu contra marcadores de neuroinflamação em camundongos.

Tanto a DP como o modelo de 6-OHDA estão diretamente relacionados com a perda de neurônios dopaminérgicos na SNc. Neste estudo mostramos que a crisina protege contra uma diminuição nos níveis de DA, DOPAC e HVA induzida pela 6-OHDA. Goes et al. (2018) relataram efeitos protetores semelhantes com o tratamento da crisina em camundongos C57B/6J, reforçando a relação entre os efeitos protetores da crisina e o metabolismo da dopamina no modelo de PD induzido por 6-OHDA. Sabe-se atualmente que a perda significativa de neurônios dopaminérgicos na SNc resulta no desenvolvimento de sintomas

comportamentais típicos da PD, como tremor, rigidez e bradicinesia (Becker et al., 2018). No entanto, é reconhecido que os pacientes com DP frequentemente sofrem de sintomas não motores, como disfunção autonômica e deterioração cognitiva (Chaudhuri & Schapira, 2009). Nós constatamos que o tratamento sistêmico com crisina atenuava a rotação contralateral e a piora cognitiva relacionado com déficits de aprendizado espacial no labirinto de Barnes e o e déficits de memória (precoce e tardia) no teste de esquiva passiva. Além disso, o declínio da memória relacionada à idade já foi parcialmente retardado pela crisina com uma dose de 1 mg/kg e normalizada na dose de 10 mg/kg (Souza et al., 2015). Usando um tratamento similar, Goes et al. (2018) relataram que a crisina também atenuou as rotações induzidas pela apomorfina (discinesia) em camundongos.

O óxido nítrico (NO) tem muitos papéis fisiológicos no sistema nervoso. No entanto, em condições patológicas como a DP, ele pode contribuir tanto para o estresse oxidativo como para a neurodegeneração (Kavya et al., 2006). Por exemplo, o excesso de NO contribui para a morte de neurônios dopaminérgicos e, eventualmente, o desenvolvimento de sintomas de DP (Kavya et al., 2006). Neste contexto, nós demonstramos um aumento na síntese de NO concomitante ao aumento da geração de RS e dos níveis de HNE (um índice de peroxidação lipídica) em camundongos tratados com 6-OHDA. Além disso, a diminuição dos níveis de GSH e o aumento da atividade da NADPH oxidase indicam ainda condições favoráveis à ocorrência de estresse oxidativo após a injeção de 6-OHDA. Isso é particularmente interessante considerando que a GSH é uma importante defesa antioxidante e que a NADPH oxidase é uma enzima geradora de RS que produz uma grande quantidade de RS no cérebro e desempenha um papel fundamental na neurodegeneração dopaminérgica na DP (Zhou et al., 2018). É importante ressaltar que a crisina preveniu todas as alterações relacionadas ao estresse oxidativo induzidas pela injeção de 6-OHDA em camundongos fêmeas idosas, apoiando a ideia de que um mecanismo importante subjacente a seus efeitos benéficos no modelo 6-OHDA de PD é a melhoria de equilíbrio redox. De acordo com essa visão, é notável notar que a crisina demonstrou efeitos antioxidantes similares em modelos de prejuízo cognitivo relacionado à idade (Souza et al., 2015) e estresse leve imprevisível crônico (Borges et al., 2015).

Considerando os potenciais alvos do estresse oxidativo, a Na^+, K^+ -ATPase parece ter um papel chave, uma vez que sua atividade é suscetível à RS, produtos de peroxidação lipídica e oxidação de grupos sulfidrila (Dobrota et al., 1999). No presente estudo, a crisina preveniu o aumento da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, desencadeada pela 6-OHDA. A proteção da atividade da Na^+, K^+ -ATPase pode representar um potencial mecanismo subjacente aos efeitos

benéficos da crisina sobre os testes comportamentais e cognitivos. Até certo ponto, nossos resultados vão de encontro aos de Khadrawy e colaboradores (2017) que relataram que a cafeína atenuou o estresse oxidativo e o comprometimento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no modelo de PD induzido pela rotenona. Além do estresse oxidativo, a inflamação crônica está associada com amplo espectro de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, incluindo AD, esclerose lateral amiotrófica e DP (McGeer & McGeer, 2004). As respostas inflamatórias como ativação de microglia e acúmulo de mediadores inflamatórios no estriado desempenham um papel na progressão da DP (Goes et al., 2018). De fato, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β induzem danos neuronais e, portanto, a supressão da sua sinalização é importante no tratamento de doenças neurodegenerativas (McGeer & McGeer, 2004). Assim, nossos resultados concordaram com essa visão, uma vez que a crisina diminuiu o aumento do TNF- α e da IL-1 β no estriado de camundongos fêmeas idosas induzido pela 6-OHDA. Esses resultados corroboram com a eficácia da crisina contra a neuroinflamação, já demonstrada usando modelos *in vitro* (Lee et al., 2017) e modelos *in vivo* (Goes et al., 2018).

Uma das principais características do modelo de EAE induzido por MOG é a redução do peso corporal e aparecimento de sintomas como paralisia do tórax e dos membros posteriores (Giacoppo et al., 2015). Como esperado, os camundongos do grupo EAE/veículo perderam peso e apresentaram os maiores escores da doença (cerca de 5 pontos na escala de classificação da doença), resultados em concordância com estudos anteriores de Giacoppo et al., (2015), Khezri et al., (2018) e Mahmoodi et al. (2019). O tratamento com crisina na dose de 20 mg/kg protegeu os camundongos contra a indução da doença, atrasando o início dos sinais e atenuando os escores clínicos.

Os efeitos neuroprotetores e imunossupressores dos inibidores da histona desacetilase (HDACi) sugerem que o HDACi pode potencialmente ser útil para o tratamento de doenças neuroinflamatórias incluindo EM. No presente estudo, a crisina modulou a atividade da HDAC bloqueando o aumento da atividade em camundongos tratados com EAE. A inibição de HDACs pela crisina foi previamente relatada *in vitro* por Pal-Bhadra et al. (2012) e Kanwal et al. (2016). Neste estudo mostramos pela primeira vez que a inibição da HDAC pela crisina também ocorre *in vivo*. Estudos recentes sugerem as potenciais vantagens na utilização de inibidores da GSK-3 β e de HDAC em vários modelos *in vitro* e *in vivo* de doenças neurológicas (Sharma & Talyan, 2015). No presente estudo o tratamento com crisina reduziu os níveis de GSK-3 β do grupo EAE/crisina e inibiu a atividade da HDAC, concordando com o cenário descrito por Bardai et al., (2015), que propôs uma possível ligação entre GSK-3 β e histona desacetilases (HDACs). Além disso, Ryves et al. (2005) relataram que o cloreto de lítio (LiCl), um estabilizador de

humor bem conhecido, possivelmente age via inibição de GSK-3 β e HDAC. Além disso, o ácido valpróico (VPA) é um inibidor da HDAC e também da GSK-3 β , e tem sido amplamente usado na clínica como agente farmacológico no tratamento de epilepsia, transtorno bipolar, atrofia muscular espinhal e enxaqueca por quase 50 anos (Cho et al., 2012; Wang et al., 2015). Estas linhas de evidência apontam claramente para uma possível ligação entre GSK-3 β e HDAC nos processos neurodegenerativos envolvidos na neuroinflamação. Em relação a este ponto, a atenuação simultânea de HDAC e GSK-3 β pode também explicar os efeitos neuroprotetores da crisina no modelo da EAE.

A homeostase adequada da acetona das histonas é mantida pela atividade antagonica de histonas acetiltransferases (HATs) e HDACs que ativam e reprimem a expressão gênica, respectivamente (Panikker et al., 2018). No presente estudo, o tratamento com crisina aumentou as HAT3 e HAT4, enzimas com função oposta à HDAC e que são diminuídas durante neurodegeneração (Schmalbach et al., 2010). Assim, o uso de inibidores de HDAC tem sido considerado uma abordagem terapêutica atrativa (Garbes et al., 2013). Além da crisina, outros compostos bioativos também podem regular HATs e HDACs. Priyadarsini et al., (2011) relataram que a quercetina inibe a HDAC e Ruiz et al. (2007) relataram que a quercetina inibe a expressão de TNF, IFN- γ e proteína inflamatória 2 de macrófagos (MIP-2) além de modificações pós-traducionais (acetilação e fosforilação) de HAT3.

A desregulação do sistema imunológico na EAE/MS é um aspecto fundamental na iniciação e progressão da doença. A autoimunidade mediada por células T CD4⁺ é amplamente considerada como um dos aspectos mais importantes da patogênese da EM (Zhang et al., 2015). A resposta imune na EM é geralmente considerada deslocada para a produção da citocina Th1, incluindo TNF e IFN γ (Klenewietfeld et al., 2014; Zhang et al., 2014). No entanto, estudos recentes indicaram que células Th17 produtoras de IL-17 estão envolvidas e são tão críticas quanto as células Th1 (Kebir et al., 2009). Sabe-se atualmente que a linhagem Th1 pode ajudar as células Th17 a invadir o cérebro e medula espinhal, assim, desencadear EAE (Reboldi et al., 2009). No presente estudo, o tratamento com crisina reduziu as citocinas pró-inflamatórias IFN γ , TNF e IL-17, corroborando com os dados descritos por Meng et al., (2017). Com base nos nossos resultados demonstramos que a crisina apresentou efeitos protetores contra os modelos animais da DP e da EM. Estes efeitos podem ser atribuídos às propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e neuroprotetoras relatadas para a crisina.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou o efeito protetor da crisina frente a dois modelos de doenças neurodegenerativas (figuras 13 e 14)

Desta forma o presente estudo expõe a crisina como um importante alvo para mais estudos e espera-se que futuramente venha a ser um auxiliar ao tratamento à esclerose múltipla e a doença de Parkinson.

Figura 13. Mecanismo de ação da crisina no modelo da DP

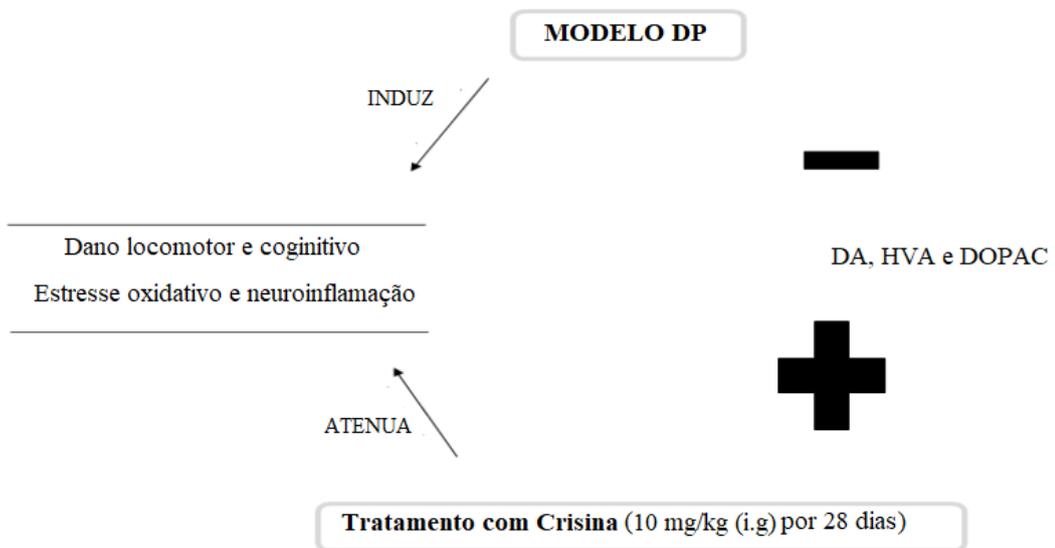
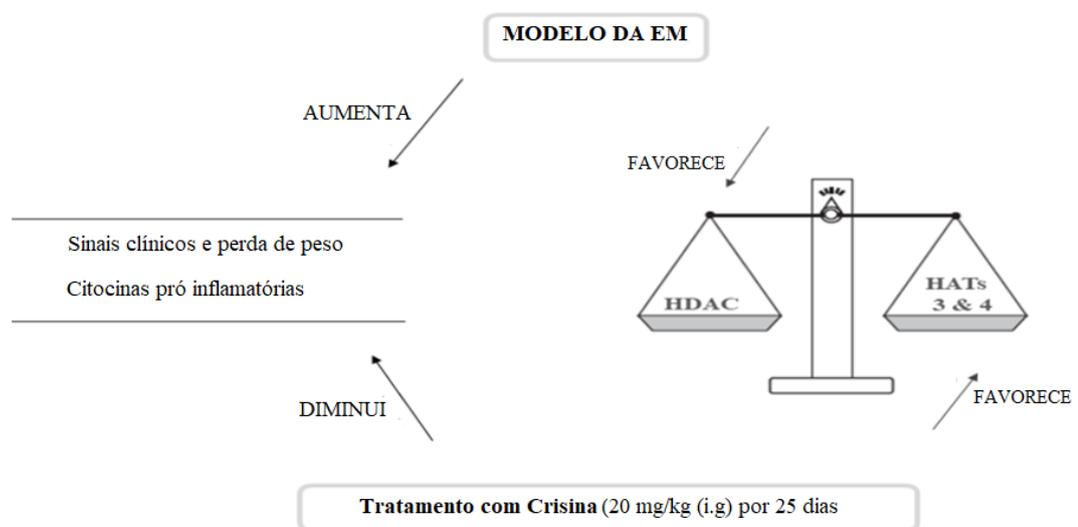


Figura 14. Mecanismo de ação da crisina no modelo da EM



6. PERSPECTIVAS

Com o objetivo de elucidar o papel do tratamento com crisina na reversão da neurodegeneração no modelo de esclerose múltipla esperamos poder verificar se a crisina reduz o infiltrado inflamatório de células T CD4+ o qual é característico tanto na EM como também na EAE. Devido ao fato do nosso grupo de pesquisa já ter apresentado um número considerável de artigos utilizando a crisina frente ao modelo de 6-OHDA, esperamos poder testar seus efeitos frente a outros modelos da DP (por exemplo a utilização do MPTP). Além disso pretendemos utilizar a crisina em outros protocolos de doenças neurodegenerativas como a doença de Huntington e a epilepsia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIROLD, Cristina. *et al.* Flavonoids in the Treatment of Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 27, p. 3228-3246, fev. 2018.

AISHWARYA, Vedagiri; SUMATHI, Thangarajan. Chrysin, a Natural Flavonoid Attenuates Cognitive Dysfunction and Neuronal Loss Associated with Amyloid β (25-35) – Induced Oxidative Stress: An Experimental Model of Alzheimer's Disease. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 2, p. 224-236, maio 2015.

ANTUNES, Michele. *et al.* Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. **Nutrition**, v. 30, n. 11–12, p. 1415-1422, dez. 2014.

Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM). **Atlas da Esclerose Múltipla**. Disponível em <http://abem.org.br/#atlas-da-esclerose-multipla-2013>. Acessado em: 09/03/2019.

BALTAZAR, Daniel Hernandez; ZAVALA, Laura Flores; VILLANUEVA, Arnulfo Olivo. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurologia**, v. 32, n. 8, p. 533-539, out. 2017.

BAUSO, Diego Javier *et al.* Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 8, p. 1108-13, ago. 2012.

BECKER, Birte. *et al.* Effect of intrastriatal 6-OHDA lesions on extrastriatal brain structures in the mouse, **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4240–4252, mai. 2018.

BELLOU, Vanessa *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 23, p. 1-9, fev. 2016.

BENAMER, Hani *et al.* Parkinson's disease in Arabs: a systematic review. **Movement Disorder**, v. 23, p. 1205-10, jul. 2008.

BLANDINI, Mondino; ARMENTERNO, Marie-Therese. Animal models of Parkinson's disease. **The FEBS Journal**, v. 279, n.7 p. 1156-1166, jan. 2012.

BOLLATI, Valentina. *et al.* DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. **Brain Behavior Immunity**, v. 25, n. 6, p. 1078-83, fev. 2011.

BORGES, Carlos Filho. *et al.* Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and NA⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: Antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v. 289, p. 367-80, mar. 2015.

CAO, Quiong. *et al.* Production of proinflammatory mediators in activated microglia is synergistically regulated by Notch-1, glycogen synthase kinase (GSK-3 β) and NF- κ B/p65 signalling. **PLoS One**. v. 12, n. 0186764, out. 2017.

CHANG, Tsung; MENDELL, Johsua. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v, 8, p. 215-239, set. 2007.

CHAUDHURI, Kallol Ray; SCHAPIRA, Aanthony. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment, **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, jun. 2009.

CHEYUO Cletos; AZIZ Monowar; WANG Ping. Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases: Role of MFG-E8. **Frontiers in Neuroscience**, jun. 2019

CIFTCI, Osman. *et al.* Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats, **Andrologia**, v. 44 n. 3, p. 181-186, mar. 2012.

CONNOLLY, Barbara; LANG Anthony. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: a review. **JAMA**, v. 311, p. 1670–83. 2014.

CONSTANTINESCU, Cris. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079-1106, mar. 2011.

COMPSTON, Alastair; COLES, Alasdair. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1502-17, out. 2008.

DASGUPTA, Subhajit *et al.* Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3874-3882, abr. 2003.

DE LAU, Lonneke; BRETELER, Monique. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-535, jun. 2006.

DEL FABBRO, Lucian *et al.* The flavonoid chrysin protects against zearalenone induced reproductive toxicity in male mice. **Toxicol**, v. 165, p. 13-21. jul. 2019

DELDAR Yaghoub *et al.* An in vitro examination of the antioxidant, cytoprotective and anti-inflammatory properties of chrysin-loaded nanofibrous mats for potential wound healing applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 706-716, jun. 2018.

DIAS, Vera Lúcia Mendes; JUNN, Eunsung; MOURADIAN, Maral. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013.

DOBROTA, Dusan *et al.* Na/K-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 19, n. 1, p.141–149, fev. 1999

DONATO, Franciele. *et al.* Evidence for the Involvement of Potassium Channel Inhibition in the Antidepressant-Like Effects of Hesperidin in the Tail Suspension Test in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 7, jun. 2015.

DUNCAN, Gordon *et al.* Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms. **Movement Disorders**, v. 29, n. 2, p. 195–202, out. 2014.

DURING, Alexandrine; LARONDELLE, Yvan. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: structure-activity relationships of flavones, **Biochemical Pharmacology**, v. 12, n. 12, p. 1739–1746, dez. 2013.

ELBAZ, Alexis *et al.* Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, n. 1, p. 25-31, fev. 2002.

ELSISI, Nahed *et al.* Ibuprofen and apigenin induce apoptosis and cell cycle arrest in activated microglia. **Neuroscience Letters**, v. 375, n.2, p. 91-96, fev. 2005.

EPPS, Van Heather. Thomas Rivers and the EAE model. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 1, p. 4, 2005.

FERNANDES, Itana; FILHO, Antônio de Souza Andrade. Estudo clínico-epidemiológico de pacientes com doença de parkinson em salvador-bahia. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 45-59, 2018.

FURUZAWA-CARBALLEDA, Janette; VARGAS-ROJAS, María Inés; CABRAL, Antonio. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 3, p. 169-175, jan. 2007.

GALLUD, Lola. *et al.* Multiple sclerosis as first manifestation in oral and facial area: presentation of four cases. **Oral Medicine and Pathology**, v. 11, n. 1, p. 141-5, 2006.

GE, Zhenzhen. *et al.* Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Experimental Neurology**, v. 241, p. 56–66, mar. 2013.

GIBB, William; LEES Andrew. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 745–52, jun 1988.

GOES, André Tiago Rossito *et al.* Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: involvement of neuroinflammation and neurotrophins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 111-120, jan. 2018.

GOLD, Ralf; LININGTON, Christopher; LASSMANN, Hans. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain**, v. 129, n. 8, p. 1953-1971, ago. 2006.

GOSCHL, Lisa *et al.* A T cell-specific deletion of HDAC1 protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunity**, v. 86, p. 51-61, jan. 2018.

GOVERMAN, Joan. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393-407, jun. 2009.

GROSSO, Clara. *et al.* The Use of Flavonoids in Central Nervous System Disorders. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 37, p. 4694-4719, 2013.

HAFLER, David. *et al.* Multiple sclerosis. **Immunology Review**, v. 204, p. 208-231, mar. 2005.

HE, Xiao Li. *et al.* Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 680, n. 1-3, p. 41-48, abr. 2012.

HERNANDEZ, Dena. *et al.* Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. **Human Molecular Genetics**, v.20, n. 6, p. 1164-72, mar. 2011.

HOGLUND, Kina; SALTER, Hugh. Molecular biomarkers of neurodegeneration, **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 8, p. 845-861, 2013.

HORNYKIEWICZ, Oleh; KISH, Stephen. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. **Advances in neurology**, v. 45, p. 19-34, 1987.

HUGHES, Andrew, DANIEL, Susan, LEES, Andrew. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. **Neurology**, v. 57, p. 1497-99, 2001.

JANKOVIC, Joseph *et al.* Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. **Neurology**, v. 40, n. 10, p. 1529-34, nov. 1990.

KALIA, Lorraine; ANTHONY, Lang. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896-912, abr. 2015.

KALOGEROPOULOS, Nick. *et al.* Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 378-385, maio 2013.

KANWAL, Rajnee. *et al.* Dietary Flavones as Dual Inhibitors of DNA Methyltransferases and Histone Methyltransferases. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, set. 2016.

KANAAN, Nicholas; KORDOWER, Jeffrey; COLLIER, Timothy. Age-related changes in glial cells of dopamine midbrain subregions in rhesus monkeys. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 6, p. 937-952. jun. 2010.

KANEGAWA, Naoki, *et al.* In vivo evidence of a functional association between immune cells in blood and brain in healthy human subjects. **Brain Behavior Immunity**, v. 54, p. 149–57, jan. 2016.

KAVYA, Ramkumar. *et al.* Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, v. 15, n.4, p. 280-294, dez. 2006.

KHADRAWY, Yasser. *et al.* Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of parkinson's disease induced by rotenone. **Journal of Dietary Supplements**, v. 14, n. 5, p. 553-572, 2017.

KORDOWER Jeffrey; BJORKKLUND Anders. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 96-109, fev. 2013.

KOVACS, Garbor. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. **Neuropathology**, v. 145, p. 301–307, 2018.

KOVACS, Gabor; Botond, Gergő; Budka, Herbert. Protein coding of neurodegenerative dementias: the neuropathological basis of biomarker diagnostics. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 4, p. 389-408, abr.2010.

KOWAL, Stacey. *et al.* The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States, **Movement Disorders**, v. 28, n. 3, p. 311-318, mar. 2013.

KUCUKALI, Cem Ismail. *et al.* Epigenetics of Multiple Sclerosis: An Updated Review. **Neuromolecular Medicine**, v. 17, n. 2, P. 17:83-96, 2015.

LANA-PEIXOTO, Marco Aurélio. *et al.* Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla: III diretrizes baseadas em evidências e recomendações. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, n. 3, p. 881-886, set. 2002.

LEE, Bo Kyung; LEE, Won Jae; JUNG, Yi-Ssook. Chrysin attenuates VCAM-1 expression and monocyte adhesion in lipopolysaccharide-stimulated brain endothelial cells by preventing NF-kappaB signaling, **International Journal Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, pg. 1424, jul. 2017.

LINDVALL, Olle. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease-give up or move forward? **Movement Disorders**, v. 28, n. 3, p. 268-73, mar. 2013.

MAASZ, Gabor. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 2, p. 127-139, fev. 2017.

MANACH, Claudine. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANDIA, Daniele, *et al.* Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 6, p. 6417-32, jun. 2014.

MANI, Renuka; NATESAN, Vijayakumar. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v.145, p. 187-196, jan. 2018.

MARRAS Connie; LANG Aanthony. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? **Movement Disorders**, v. 84, n. 4, p. 409-15, 2013.

MCGEER, Patrick; MCGEER, Edith. Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, n 1, pg. 104-116, jan. 2004.

MEHRI, Soghra, *et al.* Chrysin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo assessments. **Iranian biomedical jornal**, v.18, n.2, p. 101-106, abr. 2014.

MERCER, Linda. *et al.* Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, v. 2, p. 339-345, jan. 2005.

MERO, Il. *et al.* Oligoclonal band status in Scadinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-10, mar. 2013.

MIX, Eilhard; MEYER-RIENECKER, Hans; ZETTL, Uwe. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. **Journal of Neurology**, v. 255, n. 6, p.7-14, jan. 2008.

MOREIRA, Marcos. *et al.* Chemokines in the cerebrospinal fluido f pacientes with activa and stabile relapsing-remitting multiple sclerosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 441-445, abr. 2008.

MUANGPAISAN, Weerasak; HORI, Hiroyuki; BRAYNE, Carol. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. **Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 6, p. 281-93, nov. 2009.

NABAVI, Seyed Fazel. *et al.* Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 224-231, 2015.

NALLS, Mike. *et al.* Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. **Nature Genetics**, v. 46, p. 989-993, jul. 2014.

NEAL, Matthew; RICHARDSON, Jason. Epigenetic Regulation of Astrocyte Function in Neuroinflammation and Neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1864, n. 2, p. 432-443, fev. 2018.

NICOLETTI, Ferdinando. *et al.* Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. **Journal Neuroimmunology**, v. 70, n. 1, p. 87-90, nov. 1996.

NORRIS, Erin. *et al.* Reversible inhibition of α -synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21212–21219, jun. 2005.

OKUBADEJO, Njideka. *et al.* Parkinson's disease in Africa: a systematic review of epidemiologic and genetic studies. **Movement Disorders**, v. 21, n. 12, p. 2150-56, dez. 2006.

MARK, Peakman; VERGANI, Diego. **Imunologia: Básica e Clínica**. 2. ed. Editora Elsevier, 2011.

PEÑA-ALTAMIRA, Emiliano, *et al.* Nutritional and Pharmacological Strategies to Regulate Microglial Polarization in Cognitive Aging and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 175, 2017.

PEREIRA, Valéria Coelho Santa Rita. et al. Clinical response to interferon beta and glatiramer acetate in multiple sclerosis patients: a brazilian cohort. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 70, n. 10, p. 774-779, 2012.

POSER, Charles; BRINAR, Vesna. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 106, n. 3, p. 147-158, jun. 2004.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINGILI, Ravindra Babu. *et al.* A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents. **Chemico Biological Interactions**, v. 308, p. 51-60, ago. 2019.

PRICE, Kathleen; FARLEY, Irene; HORNYKIEWICZ, Oleh. Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 19, p. 293-300, 1978.

PRINEAS, John; PARRATT, John Douglas Edward. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. **Annals Neurology**, v. 72, n. 1, p.18-31, jul. 2012.

PRINGSHEIM, Tamara. *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583-1590, jun. 2014.

PUSHPAVALLI, Ganesan. *et al.* Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 631, n. 1-3, p. 36-41, abr. 2010.

RAMAGOPALAN, Sreeran. *et al.* Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 727-39, jul. 2010.

RAMAGOPALANM, Sreeran. *et al.* Chaplin, G. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England. **Neurology**, v. 76, n. 16, p. 1410, mai. 2011.

RAMOS, Anderson Daniel. Imunomodulação da encefalomielite experimental pelo extrato da glândula salivar do *Aedes aegypti*. Orientador: Anderson de Sá Nunes. 2014. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RAZA, Chand; ANJUM, Rabia; SHAKEEL, Noor ul Ain. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. **Life Sciences**, v. 226, p. 77-90, abr. 2019.

SÁ, Maria José. *et al.* Etiopathogenesis, Classical Immunotherapy and Innovative Nanotherapeutics for Inflammatory Neurological Disorders. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 1, p. 2-20, fev. 2011.

SAHRAIAN, Mohammad Ali; ESHAGHI, Aarman. Role of MRI in diagnosis and treatment of multiple sclerosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 12, n.7, p. 609-15, 2010.

SANDERSON, Thomas. *et al.* Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 1, p. 70-79, nov. 2004.

SCHAIN, Martin; KREISL, William Charles. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders - a Review. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.17, n. 25, mar. 2017.

SCHNEIDER, Ruth; IOURINETS, Julia; RICHARD, Irene. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and manag. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 7, n. 6, p. 365-376, nov. 2017.

SHARMA, Sorabh; TALİYAN, Rajeev. Synergistic effects of GSK-3 β and HDAC inhibitors in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 38, v. 3, p. 337-49, mar. 2015.

SIMONE, De Angela. Discovery of the First-in-Class GSK-3 β /HDAC Dual Inhibitor as a Disease-modifying Agent to Combat Alzheimer's Disease. **ACS Medic Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 469-474, fev. 2019.

SILVA, Aderbal Aguiar Júnior. **O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-DOPA - evidências obtidas em modelos experimentais.** Orientador: Rui Daniel Schröder Prediger. 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SOLANKI, Isha. *et al.* Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Advances in Nutritional**, v. 6, n. 1, p. 64-72, jan. 2015.

SONG, Pingping. *et al.* Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Protein & Cell**, v. 7, n. 2, p. 114-129, jan. 2016.

SOUZA, Leandro Cattelan. *et al.* Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 22-30, jun. 2015.

SPAGNUOLO, Carmela; MOCCIA, Stefania; RUSSO, Gian Luigi. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, 105-115, jun. 2018).

STRICKLAND, Daniel; BERTONI, John. Parkinson's prevalence estimated by a state registry. **Movement Disorders**, v. 19, n. 3, p. 318-23, mar. 2004.

SUMATHI, Thangarajan; RAMACHANDRAN, Surekha; KRISHNAMURTHY, Priya. Chrysin exerts neuroprotective effects against 3-Nitropropionic acid induced behavioral despair—Mitochondrial dysfunction and striatal apoptosis via upregulating Bcl-2 gene and downregulating Bax—Bad genes in male wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.84, p. 514-525, dez. 2016.

TIWARI, Prafulla Chandra; PAL, Rishi. The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. p. 71-80, mar. 2017.

TOREL, Joseph; CILLARD, Josiane; CILLARD, Pierre. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 283-285, jan. 1986.

URDINGUIO, Rocio; SANCHEZ-MUT, Jose; ESTELLER, Manel. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: Genes, syndromes, and therapies. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11 p. 1056-1072, nov. 2009.

VAN DER STAR, Bauje. *et al.* In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 570-588, mai. 2012.

VAUZOUR, David. *et al.* The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects, **Genes & Nutrition**, v. 3, n. 3-4, p. 115-126, nov. 2008.

VON CAMPENHAUSEN, Sonja. *et al.* Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 473-490, ago. 2005.

XIAO, Jinting. *et al.* Chrysin attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing immuno-inflammatory responses. **Neuroscience**, v. 262, n. 14, p. 156-64, mar.2014.

ZARZECKI, Micheli Stéfani. *et al.* Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 200-208, dez. 2014.

ZEINALI, Majid; REZAEEC, Seyed Abdolrahim; HOSSEINZADEH, Hossein. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 998-1009, ago. 2017.

ZHANG, Kai. *et al.* Chrysin suppresses human CD14+ monocyte-derived dendritic cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 288, p. 13-20, set. 2015.

ZHENG, Long Tai. *et al.* Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 484-494, mar. 2008.

ZHOU, Yong. *et al.* Neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) against rotenone-induced oxidative damage in CATH.a neurons. **Toxicology In Vitro**, v. 50, p. 373-382, abr. 2018

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2017

Título: Investigação da via das quinureninas em um modelo de Encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Data da aprovação: 09/08/2017

Período de vigência do projeto: 09/08/2019

Pesquisadores(a): Cristiano Ricardo Jesse

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 99923-8767

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos C57BL/6
Nº de animais	40
Peso/Idade	20 - 22 g / 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas.


Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

ANEXO II



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 034/2017 - ADENDO

Título: Investigação da via das quinureninas em um modelo de Encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

Data da aprovação: 09/08/2017

Período de vigência do projeto: 09/08/2019

Pesquisadores(a): Cristiano Ricardo Jesse

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 99923-8767

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

CEUA

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos C67BL
Nº de animais	40 + 72 (acréscimo)
Peso/Idade	20 - 22 g / 18 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas

Manfredini

Prof.^a Dr.^a Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

ANEXO III



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (51) 3413-4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

PROTOCOLO N° 038/2012

DATA: 19/11/12

Título: EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBIO E DA CRISINA EM UM MODELO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS

Pesquisador: Cristiano Ricardo Jesse / André Tiago Rossito Goes

Campus: Itaqui

Telefone: 055 3433-1669

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br / andrrossitogoes@gmail.com

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria da CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

Att.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa

ANEXO IV

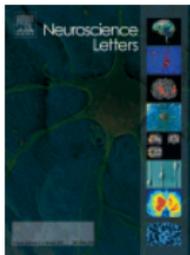


RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Chrysin protects against behavioral, cognitive and neurochemical alterations in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease

Author: Lucian Del Fabbro, André Rossito Goes, Cristiano Ricardo Jesse, Marcelo Gomes de Gomes, Leandro Cattelan Souza, Fernando V. Lobo Ladd, Aliny A.B. Lobo Ladd, Ricardo Vinicius Nunes Arantes, Astor Reis Simionato, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flavia Furian et al.

Publication: Neuroscience Letters

Publisher: Elsevier

Date: 27 July 2019

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

ANEXO V



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Chrysin suppress immune responses and protects from experimental autoimmune encephalomyelitis in mice

Author: Lucian Del Fabbro, Marcelo Gomes de Gomes, Leandro Cattelan Souza, André Rossito Goes, Silvana Peterini Boeira, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Cristiano Ricardo Jesse

Publication: Journal of Neuroimmunology

Publisher: Elsevier

Date: 15 October 2019

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com