



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

GISELLE CRISTINA BRASIL CARVALHO

**CITOPROTEÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO (AK) NA MORTE INDUZIDA POR
LPS EM CÉLULAS DE MÜLLER DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Belém

2017

GISELLE CRISTINA BRASIL CARVALHO

**CITOPROTEÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO (AK) NA MORTE INDUZIDA POR
LPS EM CÉLULAS DE MÜLLER DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Belém

2017

GISELLE CRISTINA BRASIL CARVALHO

**CITOPROTEÇÃO DO ÁCIDO KÓJICO (AK) NA MORTE INDUZIDA POR
LPS EM CÉLULAS DE MÜLLER DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Orientador)

Prof. Dr. Alejandro Ferraz Do Prado

Profa. Dra. Maria Elena Crespo Lopez

Belém

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Giselle Cristina Brasil Carvalho

Citoproteção do Ácido Kójico (AK) na morte induzida por LPS em Células de Müller de Retina de Embrião de Galinha / Giselle Carvalho. — 2018

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular. Belém, 2018.

Orientação: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

1. Retina. 2. Cultura de Glia. 3. AK. 4. LPS. I. Martins do Nascimento, José Luiz, *orient.* II. Título

CDD 571.6

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por muitas vezes ter me dado à luz que eu precisava quando tudo parecia escuro. Quero dizer que sem a força e a coragem que me induziste a lutar a cada dia eu não teria conseguido mesmo.

Gostaria de agradecer de uma forma muito especial aos meus pais, Enilson e Terezinha, sem vocês na minha luta diária eu não conseguiria mesmo. Muitas vezes eu tive muito medo, mas quando eu via o esforço que vocês faziam para me dar tudo, eu arrumava coragem para enfrentar qualquer coisa. Meus pais que, muitas vezes, compraram minhas lutas, mesmo não sabendo se expressar muito, me passava à sensação de nunca estar sozinha. Agradeço ao meu irmão, Alberto, que vendo seu empenho em ser bom no que faz, me incentivou muito a melhorar sempre.

Aos meus avós, tios, primos, por todos os momentos juntos, palavras de incentivo, carinho e orações ao longo desta caminhada.

Aos amigos do LBE e da LNMC, especialmente a Vanessa e Aldanete. A profa. Barbarella e o prof. Chubert que ajudou diretamente no meu trabalho.

Agradeço de uma forma muito especial ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, por ter me aceitado como aluna, pela paciência e oportunidades, o senhor foi muito mais que orientador, foi um amigo.

Agradeço aos meus amigos de turma da pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular, todos de alguma forma fizeram um pouco da minha caminhada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	13
2.2 CÉLULAS DE MÜLLER.....	15
2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)	17
2.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	19
2.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)	19
2.4.2 Catalase (CAT)	20
2.4.3 Glutathiona Peroxidase (GPx)	22
2.5 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL- γ -PIRONA (AK).....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 GERAL.....	26
3.2 ESPECÍFICOS.....	26
4. METODOLOGIA	27
4.1 CÉLULAS GLIAL DE MÜLLER DE EMBRIÕES DE GALINHA.....	27
4.2 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.....	27
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	28
4.3.1 Quantificação de EROs em Células de Müller tratadas com Apocinina.....	28
4.4. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	29
4.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)	30
4.4.2 Catalase (CAT)	31

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL.....	31
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	32
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AK.....	33
5.2 VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM LPS.....	33
5.3 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DO LPS APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM AK	34
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	36
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR ESPECTROFOTOMETRIA EM CÉLULAS DE GLIA DE MÜLLER TRATADAS COM APOCININA.....	37
5.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	38
5.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE.....	40
5.8 NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL.....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
6. REFERÊNCIAS	47

LISTAS DE FIGURA

Figura 1. Desenho esquemático da organização entre as Células de Muller e neurônios da retina	16
Figura 2. Isotipos da SOD.....	20
Figura 3. Estrutura química geral do ácido kójico.....	24
Figura 4. Modelo esquemático da atividade da superóxido desmutase.....	27
Figura 5. Modelo esquemático da atividade da superóxido dismutase.....	30
Figura 6. Análise da citotoxicidade do AK pela técnica do MTT.....	33
Figura 7. Análise da citotoxicidade do LPS pela técnica do MTT.....	34
Figura 8. Análise da atividade protetiva do AK em resposta a citotoxicidade causada por LPS através da técnica do MTT.....	35
Figura 9. Produção de EROs por AK.....	36
Figura 10. Produção de EROs após tratamento com apocinina.....	38
Figura 11. Atividade antioxidante da SOD em células de células de Müller tratadas com AK.....	39
Figura 12. Atividade antioxidante da Catalase em células de células de Müller tratadas com AK.....	40
Figura 13. Níveis Totais de Glutathiona em células de células de Müller tratadas com AK.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AK	5-Hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CMF	Meio Livre Sem Cálcio
CNE	Camada Nuclear Externa
CPE	Camada Plexiforme Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CPI	Camada Plexiforme Interna
CCG	Camada de Células Ganglionares
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTNB	Ácido 2-nitrobenzoico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSHPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
IL-1	Interleucina-1
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Oxido Nítrico
PBS	Tampão Fosfato Salino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico

SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	5-tio-2-ácido nitrobenzóico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
TLR 4	Toll-like 4
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LBP	Proteínas ligantes de LPS
MD-2	Proteína milelóide diferenciadora
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
AP-1	Proteína ativadora 1
NFKβ	Fator nuclear kappa β

RESUMO

5-Hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (AK), conhecido inibidor de tirosinase, enzima importante para síntese de melanina e por isso é usado para desordens de pigmentação. AK também promove significativa ativação de macrófagos e promove acúmulo citoplasmático de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que sugere seu papel como potencializador do sistema imune como microbicida. Não existe trabalho na literatura que mostra a ação do AK no sistema nervoso central (SNC) como ativador celular e seu possível papel protetor frente a infecções. Para testar essa hipótese usamos glias de Muller da retina que apresentam propriedades semelhantes aos dos macrófagos e LPS, como ativador glial. Portanto, o presente trabalho avalia a ação do AK como possível papel protetor na morte celular induzida por LPS, em cultura de células da glia provenientes de embriões de galinha. Culturas enriquecidas com células da glia, foram tratadas com AK (10, 25, 50 e 100 μ M) e LPS (0,1; 1; 10, 100 e 500 ng/mL) durante 24 horas. Após tratamento, as células não mostraram citotoxicidade tratadas com AK, entretanto, tratadas com LPS ocorreu morte celular, de uma maneira dose-dependente. Verificamos o acúmulo de EROs em grupos tratados com AK (100 μ M) e LPS (100 e 500 ng/ml), sendo que nas culturas co-tratados com AK e LPS nas mesmas concentrações houve uma redução desse acúmulo. AK também foi capaz de inibir a atividade das enzimas antioxidantes, (catalase e Superóxido dismutase) e inibir os níveis de glutathione, enquanto LPS produz um aumento na atividade dessas enzimas. AK foi capaz de inibir as enzimas antioxidantes e glutathione do aumento induzido por LPS. Esses dados revelam que AK promove a modulação do balanço oxidativo e antioxidativo como possível mecanismo protetor na morte celular produzido por LPS em células enriquecidas de Glia de Müller.

Palavras Chaves: RETINA, CULTURA DE GLIA, AK, LPS

ABSTRACT

CITOPROTECTION OF KOJIC ACID (AK) IN LPS-INDUCED DEATHS IN MÜLLER CELLS OF CHICKEN EMBRYO RETINA

5-Hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone (AK), a known inhibitor of tyrosinase, an enzyme important for melanin synthesis and therefore used for pigmentation disorders. AK also promotes significant activation of macrophages and promotes cytoplasmic accumulation of reactive oxygen species (ROS), suggesting its role as a potentiator of the immune system and microbicide. There is no work in literature that shows the action of AK in the central nervous system (CNS) as a cellular activator and its possible protective role against infections. To test this hypothesis, it use retinal Muller glia which have similar properties to those of macrophages. Therefore, the present work evaluates the action of AK as a possible protective role in LPS-induced cell death in culture of glial cells from chicken embryos. Cultures enriched with glial cells were treated with AK (10, 25, 50 and 100 μ M) and LPS (0.1, 10, 100, and 500 ng / ml) for 24 hours. After treatment, the cells did not show AK-treated cytotoxicity; however, treated with LPS, cell death occurred in a dose-dependent manner. We verified the accumulation of EROs in groups treated with AK (100 μ M) and LPS (100 and 500 ng / ml). Cultures co-treated with AK and LPS in the same concentrations there was a reduction of accumulation of EROs. AK was also able to inhibit the activity of antioxidant enzymes, (catalase and Superoxide dismutase) and glutathione levels, while LPS produces an increase in the activity of these antioxidants. AK was able to inhibit the antioxidant enzymes and glutathione from the increase induced by LPS. These data show that AK promotes the modulation of oxidative and antioxidative balance as a possible protective mechanism in the cell death produced by LPS in Müller's Glia enriched cells.

Key Words: RETINA, GLIA CULTURE, AK, LPS

1. Introdução

As células de Müller são os principais tipos de células gliais encontrados na retina dos vertebrados. Estas são células gliais radiais que, além dos neurônios, estão presentes na retina, estendendo-se por quase toda a extensão do tecido (MCGILLEM *et al*, 1998). A retina dos vertebrados é constituída por seis tipos diferentes de neurônios: fotorreceptores (cones e bastonetes), células horizontais, bipolares, amácrinas, ganglionares e pela principal glia da retina conhecida por célula de Müller (Martins e Pearson, 2007) que desempenha um papel importante na homeostasia do tecido retiniano. As células de Müller, na retina, possuem um papel semelhante ao promovido pelos macrófagos em outros tecidos que podem produzir e acumular EROs no interior das células após tratamento com LPS (Olson, 2005).

Em situações em que há injúria na retina, a glia de Müller pode proliferar, alterar sua forma, mudar o transporte de íons e secretar moléculas sinalizadoras, atuando para a proteção e reparo de células neuronais, mantendo assim a funcionalidade do tecido (DYER & CEPKO, 2000). Podemos destacar as alterações decorrentes da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), onde vários fatores contribuem para a sua formação, entre eles a alta taxa de consumo de oxigênio da retina, exposição a altos níveis de radiação, presença de células com membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, que são facilmente oxidados e fagocitados, que por si só é fonte de produtos que podem vir a danificar o tecido (Beatty *et al*, 2000).

Além disso, a superfície ocular está constantemente exposta a uma miríade de agentes patogênicos que podem danificar a fisiologia retiniana. Como modelo experimental para estudar ação desses agentes, utiliza-se, comumente, lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas, que são conhecidos como indutores da resposta inflamatória, além de ser o principal responsável pelas respostas tóxicas e inflamações sistêmicas (Rietschel *et al.*, 1994). LPS é o principal alvo de reconhecimento executado pela resposta inata e desencadeia uma ampla faixa de resposta celular ativando as vias de sinalização quando é ligado ao seu receptor de membrana, Toll –like receptor 4 (TLR-4) (Park *et al.*, 2009).

Uma das principais respostas biológicas induzidas pelo LPS é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidos principalmente pelas mitocôndrias

(Halliwell, 1999). Quando produzidos em excesso, as EROs, podem ser danosos devido ao seu acúmulo intracelular, acarretando, estresse oxidativo, responsáveis por causar o envelhecimento celular, apoptose e até mesmo o desenvolvimento de câncer. Para minimizar esses efeitos, as células possuem um sistema antioxidante, que equilibram os níveis de EROs. Este sistema é composto pelas enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSHPX) e Catalase (CAT) (Krishna *et al.*, 1996; Nohl *et al.*, 1998 & Halliwell, 1999).

Nos últimos anos, as células de Müller foram reconhecidas como um potencial alvo terapêutico para preservar a homeostase das células neuronais da retina. No entanto, nenhum trabalho na literatura avalia o papel do AK nesse tipo celular. Portanto, neste trabalho, usamos o modelo *in vitro* de células de Müller de embrião de galinhas para analisar o papel protetor do ácido kójico (AK) na produção de ERO induzidos por LPS. Com a perspectiva de avaliar o papel de AK como uma alternativa futura para tratamentos de inflamações oculares.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Células De Müller

A retina é um tecido bem organizado e faz parte do sistema nervoso central por se desenvolver a partir de brotamentos do diencefalo embrionário, possuindo neurônios sensoriais que respondem à luz, a partir de várias etapas de processamento neuronal até a formação da imagem final (Kolb, 1991). A Retina está organizada em camadas, da externa para interna, são elas: camada nuclear externa (ONL), compostas por fotorreceptores (cones e bastonetes); camada plexiforme externa (OPL), onde ocorre conexões sinápticas entre fotorreceptores, células bipolares e horizontais; camada nuclear interna (INL), compostas por células bipolares, horizontais, amácrinas e células ganglionares deslocadas; camada plexiforme interna (IPL), onde ocorrem conexões sinápticas entre as células bipolares, amácrinas e ganglionares; camada de células ganglionares (GCL), compostas por células amácrinas deslocadas e células ganglionares (Wässle, 2004).

Outros tipos de células gliais são também encontrados no SNC: Na retina dos vertebrados se encontram três tipos de células da glia, cada uma das quais exibem morfologia, padrão de desenvolvimento e características diferentes entre si. Elas são: células de müller, astrócitos e microglia. Os oligodentócitos, um quarto tipo de célula glial encontrado ocasionalmente na retina, são vistos mielinizando feixes de fibras nervosas de espécies como coelho e lebres (Bringmann et al, 2006). A célula de Müller percorre toda a extensão da retina, como mostrado na figura 1, e seu corpo celular está localizado na camada nuclear interna (Robison & Dreher, 1990). Em espécies com retinas não vascularizadas, tais como os répteis, anfíbios, aves e alguns mamíferos, a célula de Müller é a única encontrada na retina neural (Sarthy & Ripps, 2001).

A célula de Müller participa na regulação da homeostase de íons, água, pH e CO₂, controle do volume do meio extracelular, na manutenção do complexo hemato-retiniana e no fluxo sanguíneo (Bringmann *et al.*, 2004). Participa também do metabolismo de glicose, fornecendo nutrientes para os neurônios e possui uma atividade antioxidante, promovendo a neuroproteção do tecido (Bringmann *et al.*, 2006). Estas células também participam da comunicação do tecido retiniano, pelo envolvimento na fisiologia dos neurônios (Hayes *et al.*, 2007). Esse papel protetor das células de Müller tem sido bem descrito na literatura, ressaltando o papel de toxicidade pelo glutamato e óxido nítrico (NO) (Kawasaki *et al.*, 2000).

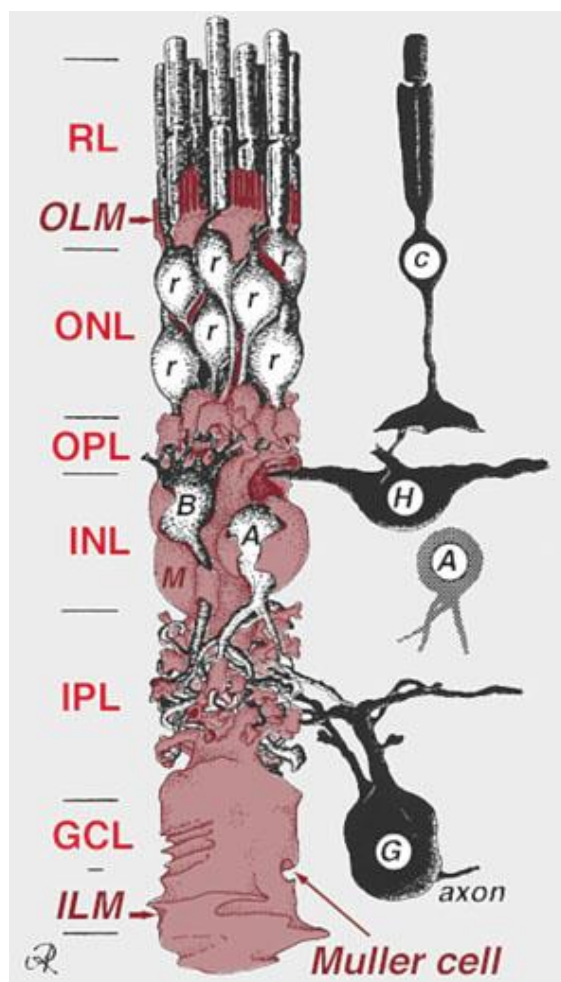


Figura 1. Desenho esquemático da organização entre as Células de Muller e neurônios da retina. A célula de Muller percorre toda a extensão da retina: ILM (Membrana Limitante Interna); GCL: Camada de Células Ganglionares; IPL: Camada Plexiforme Interna; INL: Camada Nuclear Interna; OPL: Camada Plexiforme Externa; ONL: Camada Nuclear Externa; OLM: Membrana Limitante Externa; RL: Camada de fotorreceptores. Na coluna direita temos: os fotorreceptores em cone (C), células horizontais (H), amácrinas (A) e ganglionares (G). Fonte: Kolb H, 2013.

As células de Müller são células residentes do sistema imunológico da retina, sensíveis à infecção ou alterações nos seus microambientes e que facilmente se ativam em resposta a infecções ou lesões. Após serem reconhecidos pelo seu receptor (TLR 4), essas células gliais são ativadas, desencadeando uma resposta imune inata, liberando uma variedade de fatores, incluindo citocinas, TNF- α , IL-1, radicais livres, óxido nítrico (NO) e superóxido (Kremlev *et al.*, 2004), levando a inflamação e a indução do sistema imune

adaptativo ao desencadear vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica (Glezer *et al.* 2007).

2.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina, encontrada na membrana externa de bactérias gram-negativas. A parte altamente tóxica do LPS está localizada no lipídeo A da molécula, uma porção bem conservada entre as variedades de bactérias gram-negativas (Rietschel *et al.*, 1994). LPS pode provocar uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica caracterizada por febre, coagulação intravascular difusa, choque, falência de múltiplos órgãos e, eventualmente, morte (Tuin *et al.* 2006).

O LPS é um importante ativador de vias de sinalização. Ao se ligar em seus receptores, principalmente o toll-like receptor 4 (TLR 4), localizado na membrana celular, ocorre a ativação de uma resposta imune inata, que conduz a produção de uma série de mediadores pró-inflamatórios, tais como: TNF- α , IL-1 e IL-6. Apesar do reconhecimento que LPS é capaz de ativar receptor TLR4, esta atuação não é suficiente para uma resposta imune completa. Outros componentes são necessários para o reconhecimento do LPS: proteínas ligantes de LPS (LBP), proteínas CD14 e a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) (Akira *et al.* 2004, Miyake, K. 2004). O complexo receptor TLR4-MD2 é crucial para o reconhecimento do hospedeiro e para responder a infecção bacteriana Gram-negativa (Cruz-Machado, 2010).

Quando LPS é reconhecido pelo complexo TLR4-MD2, ocorre ativação de diferentes vias de sinalização, como do MAPK, AP-1 e NFK β . A Via do NFK β é a principal via de sinalização que desencadeia uma resposta inflamatória e induz a transcrição da maioria dos genes regulados por NFK β durante uma resposta imune (Raetz & Whitfield, 2002). NFK β , é encontrado no citoplasma na forma inibida através da sua ligação com uma família de cinases denominadas IKKs. Porém, quando estimulada pela presença de LPS, essas proteínas inibitórias são fosforiladas, ubiquitinadas e degradadas, liberando o NFK β para que se transloque ao núcleo, promovendo assim a transcrição de genes (Baeuerle e Baltimore, 1988b).

O sistema imunológico desempenha papel essencial na manutenção da homeostase dos tecidos e a resposta à infecção ou lesão. Microglia são as principais células imunes residentes no cérebro, onde estão, constantemente, reparando o microambiente e em

certas situações de injúrias, produzem fatores que influenciam os astrócitos circundantes (outro tipo de célula glial com funções de suporte). Sob condições fisiológicas, a microglia exibe um fenótipo desativado que está associado com a produção de fatores antiinflamatórios e neurotróficos (Glass, 2010).

Uma inflamação crônica, principalmente, a partir de uma falha nos mecanismos antiinflamatórios, pode resultar em patologia tecidual. Embora alguns estímulos inflamatórios induzam efeitos benéficos, como a ativação de células apoptóticas, processos de reparação de tecidos, entre outros. A inflamação não controlada pode resultar na produção de fatores neurotóxicos que amplificam os estados patológicos subjacentes (Glass et al., 2010).

2.3 Espécies Reativas De Oxigênio (EROs)

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são produzidas por todas as células eucarióticas (Halliwell *et al*, 1999). Os tipos de EROs incluem radicais hidroxil (OH^-), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO). Esses radicais são transitórios devido à sua alta reatividade química em conduzir a peroxidação lipídica, oxidação de certas enzimas e uma grande oxidação e degradação de proteínas (Mate *et al.*, 1999a). Além disso, EROs possuem funções de sinalização, regulação de vários processos metabólicos, como exemplo a proliferação, diferenciação e migração celular (Rhee *et al*, 2006).

A produção de EROs ocorre principalmente nas mitocôndrias, onde dois grandes sítios da cadeia respiratória foram estabelecidos: o complexo I da cadeia respiratória (NADH: ubiquinona oxidoreductase) (Ambrosio *et al*, 1993) e complexo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductase) (Lesnefsky *et al*, 2001).

Em condições normais, a produção desses radicais ocorre em diferentes processos metabólicos, tais como a geração de ATP e transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, onde é utilizada a oxidação controlada por doadores de elétrons como o NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo) e FADH (Flavina-Adenina-Dinucleotídeo) para a produção de energia potencial. Os elétrons derivados do NADH ou FADH podem reagir diretamente com o oxigênio ou com outros receptores de elétrons em vários pontos da cadeia transportadora, gerando EROs, promovendo participações nos

processos de respiração celular, fertilização do óvulo, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção (Barbosa *et al.*, 2010, Teixeira *et al.*, 2010).

Dessa forma, EROs são átomos quimicamente ativos ou moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons na sua órbita externa, e também participam na defesa do organismo contra patógenos, porém em excesso pode promover um estresse oxidativo que é responsável pelos efeitos patológicos, que vão desde a fosforilação oxidativa (FOX), disfunção de doenças neurodegenerativas crônicas e câncer (Rhee *et al.*, 2006). No sistema nervoso central (SNC), em resposta a lesões ou infecções, todas células podem produzir ou liberar mediadores inflamatórios, incluindo: citocinas, fator de necrose tumoral α (TNF- α), Interleucinas (IL-1 e IL-6), prostaglandinas, EROs e ERNs (Agostinho *et al.* 2010).

Os neurônios do SNC são vulneráveis ao estresse oxidativo causado por EROs. Esses radicais desempenham papéis cruciais na neurotoxicidade, por possuir capacidade de oxidar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e, como consequência, promove vários distúrbios neurodegenerativos (Tanaka, 2013). Por não possuir altas taxas metabólicas, os neurônios apresentam baixas atividades regenerativas e antioxidativas (baixos níveis de agentes antioxidantes), sendo assim, mais susceptíveis aos danos causados por EROs (Andersen, 2004). Nita *et al.*, citam uma gama de neuropatias causadas pela participação de EROs, tais como: distrofia corneal, causada por apoptose da córnea; glaucoma, por ativação de vias apoptóticas e inflamatórias da malha trabecular; apoptose de células ganglionares e disfunção glial no segmento posterior ocular (Nita *et al.* 2016).

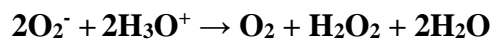
A geração aumentada de ROS resulta na ativação de NF- κ B, que por sua vez induz a expressão de marcadores inflamatórios. A ativação da via de curto prazo ROS/NF- κ B contribui para a diminuição da pressão intraocular. Entretanto, sua estimulação crônica exerce efeitos patológicos que induzem o glaucoma.

As células buscam equilibrar esse estresse oxidativo com a atividade de enzimas antioxidantes, tais como a Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GSHPX) e catalase (CAT). Dessa forma, estas enzimas antioxidantes servem como linha de defesa no controle dos radicais livres endógenos. Assim, a capacidade antioxidante demonstrada em algumas células patogênicas ou não (ex: macrófagos ou parasitas), está relacionada com a sobrevivência celular (Barra, 2010).

2.4 Enzimas Antioxidantes

2.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima Superóxido dismutase (SOD) é considerada uma metaloenzima que catalisa a dismutação O_2^- em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como mostrado no esquema 1, que posteriormente será catalisada pelas enzimas catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase. McCornrd e Fridovich em 1969 descreveram a função catalítica de transferir o ânion radical superóxido (Augusto, 2006).



Esquema 1: Reação enzimática da SOD

A SOD está presente em várias organelas dentro da célula e possui três isotipos que são caracterizados em Cu-ZnSOD (SOD 1) que se encontra no citoplasma, núcleo, e do espaço intermembranar das mitocôndrias; MnSOD (SOD 2) se localiza na matriz mitocondrial; e Cu-ZnSOD está presente no espaço extracelular sob forma de um homotetramero glicosilado, semelhante a SOD2, porém interligados com íons de cobre e zinco (Cu-Zn-SOD), semelhante a SOD1 (Buettner *et al.*, 2011), figura 2.

(SOD) mitocondrial (MnSOD) e citossólica (CuZnSOD).

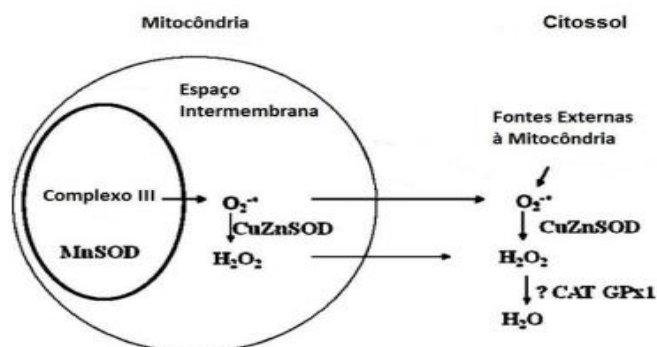


Figura 2. Isotipos da SOD. A superóxido dismutase (SOD) é encontrada em três isoformas: nuclear (Cu/Zn SOD), mitocondrial (Fe-SOD) e citossólica (Mn-SOD). Fonte: Jackson, 2009.

A SOD se encontra abundantemente em células de todo o corpo humano. A literatura relata que a expressão dessa enzima antioxidante em mamíferos foi importante para o conhecimento a respeito da toxicidade do oxigênio, por comprovar a existência de mecanismos endógenos para a eliminação de $O_2^{\cdot-}$ (Leite *et al.*, 2006). Resultados mostrados por Blois (2013) sugeriram que o ácido fólico (AK) promovia acúmulo de oxigênio reativo por mecanismos que induzem inibição do perfil antioxidante em macrófago, através da diminuição dos níveis da atividade de SOD, precursora da cascata antioxidante enzimática. Em modelos de roedores, a superexpressão de SOD nas mitocôndrias dos fotorreceptores, mostraram diminuição na degeneração e danos oxidativos, prolongando a sobrevivência retina (Usui *et al.*, 2011).

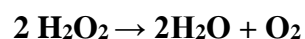
2.4.2. Catalase (CAT)

Também conhecida como hidroxilase, a catalase (CAT) é uma enzima intracelular e extracelular que possui quatro cadeias polipeptídicas na sua estrutura quaternária e está presente na maioria dos organismos vivos. Cada cadeia polipeptídica liga um grupo heme ligados em um íon de ferro, caracterizando um centro metálico onde

ocorre a reação com o H₂O₂. Sua síntese é promovida no retículo endoplasmático rugoso, sendo posteriormente acumulada no interior de peroxissomos. Sua principal função é decompor o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, como demonstrado no esquema 2, além de realizar oxidação de alcoóis por peróxidos de hidrogênio, resultando em aldeídos (Nita, 2016). A CAT tem como função, equilibrar o balanço oxidativo após determinado aumento significativo dos níveis de H₂O₂ que pode ocasionar estresse e danos celulares (Chiang, 2012), uma vez que este é capaz de atravessar camadas lipídicas, reagir com membranas celulares e com proteínas ligadas ao ferro, tornando-se tóxico para as células (Eaton, 2011).

O H₂O₂ é um subproduto secundário do metabolismo celular e sua síntese envolve a decomposição espontânea ou catalítica de superóxido (O₂⁻), produzido pela redução parcial de oxigênio durante a respiração aeróbia e após a exposição de células a uma variedade de agentes biológicos, físicos e químicos (Veal, 2007). O H₂O₂ se relaciona com a resposta imune do hospedeiro, agindo contra diferentes tipos de microrganismos. Porém, H₂O₂ é prejudicial ao organismo devido reações que podem levar à toxicidade, alergia, mutagenicidade e/ou carcinogenicidade, danos ao DNA ou outros componentes essenciais das células dependendo da concentração do peróxido e do tipo celular (Matés *et al.*, 2000)

Pesquisas com ratos modificados geneticamente para superexpressar CAT favoreceram em 50% a sobrevivência, correlacionando a enzima com mecanismos que favoreçam o envelhecimento ligado ao estresse oxidativo (Johnson, 2007).



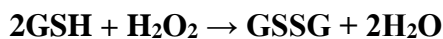
Esquema 2: Reação enzimática da CAT

A CAT é muito importante para os organismos vivos aeróbicos por metabolizar e diminuir níveis elevados de H₂O₂, preservando o ambiente intracelular (Martins, 2014). Segundo alguns estudos descritos na literatura, a deficiência dessa enzima em humanos pode aumentar a probabilidade de o indivíduo desenvolver diabetes do tipo 2, devido o acúmulo de H₂O₂ nos tecidos pancreáticos e comprometendo assim a síntese e liberação de insulina (László Góth, 2008). A CAT também protege ao retirar o H₂O₂ que degrada a parede responsável pela separação da circulação sanguínea sistêmica com o SNC (Lefevre, 2014). No sistema nervoso central, os níveis de catalase são pequenos no

hipotálamo e na substância negra, e ainda menores no cerebelo e no córtex devido baixos níveis de peroxissomas (Halliwell, 2001).

2.4.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A Glutathione Peroxidase (GPx) é outra enzima com função de peroxidase, pertencentes à uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas. As GPx são conhecidas por catalisar a redução de H₂O₂ em água e glutathione oxidada (GS-SG), utilizando glutathione reduzida (GSH) (Brigelius-Flohé, 2013). Abaixo segue os mecanismos enzimáticos, de acordo com Huber (2008), envolvidos na oxidação de H₂O₂ com a Glutathione reduzida (GSH) produzindo a Glutathione oxidada (GSSG) e H₂O (Esquema 3).



Esquema 3: Reação enzimática da GPx. GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada.

A glutathione reduzida é um tripeptídeo linear, constituída por três aminoácidos (ácido glutâmico, cisteína e glicina), formando a gama-glutamilcisteinilglicina. Sua produção ocorre normalmente no fígado e se encontra presente em todos os organismos aeróbicos. A GSH é caracterizada por importantes funções, como proteger, biotransformar e eliminar xenobióticos.

A glutathione reduzida reage e oxida o H₂O₂ produzindo H₂O e GSSG. Para que a atividade de eliminação de espécies antioxidante seja mantida, a GSH deve ser regenerada à partir da atividade da glutathione redutase (GR) na presença de NADPH, promovendo assim um ciclo catalítico importante para um atividade protetora. Dessa forma, níveis de GSH contribuem para a proteção contra os danos oxidativos, sendo um bom marcador de estresse oxidativo (Huber *et al*, 2008).

Devido a GSH ter suas propriedades antioxidantes, ela também atua na síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular, desintoxicação de xenobióticos e redução de hidroperóxidos, bem como protege o organismo contra a ação de microorganismos.

Normalmente, a síntese e o metabolismo da glutatona se relacionam com doenças devido ao seu nível significativo no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (HUBER *et al*, 2008).

2.5 AK [Hidroxi-2-Hidroximetil- γ -Pirona]

O AK é um metabólito secundário produzido por algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*, com diferentes funções, dentre estas podemos citar: inibidor de melanina por inibir a atividade da enzima tirosinase (Chang, 2009; Lima *et al*, 2014), podendo ser usado como um clareador da epiderme (Lim *et al*, 1999; Nohynek *et al*, 2004; Lin *et al*, 2007; Mi Ha *et al*, 2007), além de ser usado como um aditivo alimentar para evitar o escurecimento dos alimentos, através da prevenção de melanose em produtos vegetais e de frutos do mar, pela inibição na oxidação de DL-Dopa (Blumenthal *et al*, 2004; Bentley *et al*, 2006).

Na literatura se demonstra que o ácido kójico aumenta a fagocitose dos neutrófilos e a proliferação de linfócitos, elevando o número de leucócitos enquanto eliminam as espécies reativas de oxigênio geradas nos tecidos ou no sangue (Niwa, 1991). Tamura *et al.*, 2006, demonstrou que o AK não apresenta atividade de iniciação do tumor e Gomes *et al*, 2001, verificou atividade antioxidante potencial em tampão fosfato.

Dentre esses afeitos, tem-se demonstrado a capacidade de ativar macrófagos a partir de um mecanismo dependente da produção de EROs, originando mudanças fisiológicas e morfológicas que estão diretamente relacionadas a atividade microbicida dessas células (Rodrigues *et al.*, 2011). Frade *et al.*, 2012 mostrou que o AK ativa neutrófilos provenientes de sangue periférico, também por uma via dependente da produção de EROs. Além disso, neutrófilos tratados com AK demonstraram aumento na quantidade de cálcio intracelular, ion responsável na produção de mediadores inflamatórios e ativação celular.

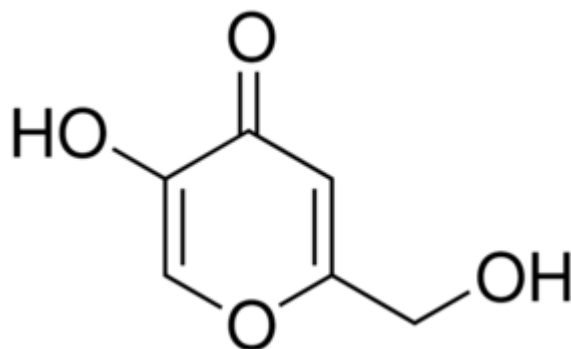


Figura 3. Estrutura química geral do ácido kójico.

Estudos realizados por Batistuzzo *et al*, (2002) mostraram que o AK atua na melanogênese, promovendo a inibição da enzima tirosinase, impedindo a formação da melanina. A melanina é a principal responsável pela formação do pigmento da pele, do cabelo e dos olhos (Silverio *et al*, 2013). O mecanismo de inibição da tirosinase pelo AK ainda não está bem caracterizado, porém estudos mostram sua capacidade de quelar íons cobre, um co-fator da enzima tirosinase, através da afinidade pelo sítio ativo desta enzima e também por se ligar em um sítio diferente do ativo, realizando inibição não competitiva (Sendovski *et al.*, 2011).

O ácido kójico foi obtido comercialmente, porém é uma molécula que pode ser sintetizada experimentalmente, além de ser um importante alvo para outros derivados, promovendo a produção de diferentes metabólitos com características semelhantes do original, porém de melhor acesso e possivelmente com efeito biológico melhor, tais como descrito por Li *et al*, (2013). Esse metabólito secundário também pode ser obtido de acordo como proposto com Alberdan Santos *et al* (2011), utilizando Sacarose como Fonte de Carbono. Os efeitos do AK em macrófagos estão associados com ativação celular e produção de radicais livres (Rodrigues *et al*, 2011).

Buscando verificar a atividade do AK como ativador de células imunocompetentes, analisamos células de Müller na retina, estas apresentam papel semelhante ao promovido pelos macrófagos em outros tecidos e que podem produzir e acumular EROs no seu interior. Nesse trabalho, usamos o modelo *in vitro* de células de Müller de embrião de galinhas para analisar o papel protetor do AK na produção de EROs em modelo de inflamação induzido por LPS. Neste trabalho, buscamos uma possível atividade do AK

em células gliais da retina como alternativa futura para tratamentos de inflamações oculares.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação citoprotetora do AK e a modulação no balanço oxidativo, como possível mecanismo protetor na morte celular induzida por LPS em células enriquecidas de Glia de Müller.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do AK e LPS nas células de Müller pelo método de MTT;
- Avaliar a ação protetora do AK na citotoxicidade induzida por LPS nas células de Müller;
- Avaliar o acúmulo de EROs e a ação protetora de AK em células de Müller tratadas com LPS;
- Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes após tratamento com AK em células de Müller tratadas com LPS;

4. Metodologia

4.1 Cultura de células Gliais de Müller oriundas de embriões de galinhas

Todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados e realizados com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (Protocolo Número 80/15). As culturas primárias de células da retina foram obtidas de embriões de galinha com nove dias de desenvolvimento (E9). Após enucleação do globo ocular dos embriões, em meio livre de cálcio (CMF), as retinas foram dissociadas quimicamente com tripsina (0,05%) por 10 minutos a 37°C, seguindo posteriormente com uma dissociação mecânica e distribuição em placas de 24 poços. As culturas foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de soro fetal bovino (SBF), mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar (Reis *et al.*, 2008).

Para a obtenção de células purificadas de glia de Müller, os neurônios foram cultivados por três semanas, favorecendo a proliferação das células gliais, porém, o meio de cultura era trocado uma vez por semana, com o objetivo de fornecer acidificação no ambiente e a morte dos neurônios, permanecendo somente a glia.

4.2 Viabilidade Celular Pelo Método Do MTT

Para os ensaios de viabilidade celular as culturas enriquecidas de glia (plaqueadas 10⁶ células/poço), foram verificados primeiramente a citotoxicidade das drogas que seriam trabalhadas, onde as células foram tratadas em diferentes concentrações de AK (10, 25, 50 e 100 µM) e, também, diferentes concentrações de LPS (0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 10 ng/ml; 100 ng/ml e 500 ng/ml), posteriormente incubadas em placas de 24 poços por 24 horas. Foi realizado também um pré-tratamento com AK (100 µM), durante 6h, seguido do tratamento com LPS (100 e 500 ng/mL), totalizando 24 h de tratamento, buscando avaliar se o AK protege a glia de müller antes do tratamento com LPS.

A citotoxicidade dos compostos usados foi analisada pelo método do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2-5-difenil-2H-tetrazolium bromídrico), no qual células viáveis reduzem o composto MTT ao composto formazam, formando uma coloração de cor azul, o qual pode ser quantificado em espectrofotometria com comprimento de onda de 570 nm.

Após os respectivos tratamentos com AK e LPS, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com solução de MTT (0,5 mg/ml) em meio DMEM sem soro por duas horas. Após esse período, o meio de cultura contendo o MTT foi removido e adicionado 500 µl de DMSO em cada poço. Posteriormente, 200 µl da solução foi transferida para uma placa de 96 poços e lido em leitor de microplaca com a utilização de um feixe de luz com comprimento de onda de 570 nm (Mosmann *et al.*, 1983).

4.3 Quantificação de espécies reativas de Oxigênio por espectrofotometria

O experimento é baseado na oxidação do NBT (*Nitroblue Tetrazolium*), de coloração amarela, por oxigênio reativo (O_2^-) com formação intracelular de partículas de coloração azul, chamado corante formazan de NBT (Choi *et al.*, 2006).

Para a quantificação de NBT, as células foram lavadas com PBS e fixadas em metanol e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, o formazan insolúvel em água foi solubilizado com 120 µl de KOH 2M e 140 µl de DMSO. A densidade óptica foi lida em leitor de microplacas com comprimento de onda 620 nm de acordo com Choi *et al.*, (2006).

4.3.1 Quantificação de EROs em Células de Müller tratadas com Apocinina

A apocinina é um constituinte da erva medicinal *Picrorhiza kurroa*. É um inibidor da *Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidase* (NADPH Oxidase), complexo enzimático responsável pela produção de EROs. Este composto mostra potenciais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e foi testado como um neuroprotetor em muitos modelos animais de doenças cerebrais (okamura, 2017). A apocinina foi adquirida da *Sigma* (St. Louis MO, USA).

Para confirmar a via de produção de radicais através da ativação do complexo NADPH foi utilizado a apocinina como inibidor da NADPH oxidase e organizamos o experimento em grupos mostrados na tabela seguinte:

Concentração

Tempo (h)

Controle	-	24
LPS	100ng/ml	24
AK	100 μ M	24
APO	50 μ M	1
CO-TRATAMENTOS		
Apo+AK+LPS	50 μ M/100 μ M/100ng/ml	1/6/18
APO+LPS	50 μ M/100ng/ml	1h/18
AK+LPS	100 μ M/100ng/ml	6/18
AP+AK	50 μ M/100 μ M	1/23

Tabela 1. Concentrações dos grupos tratados e co-tratados com AP para a quantificação de EROs.

A concentração de apocinina foi baseada de acordo com Rodrigues et al. (2011). As análises de EROs foram quantificadas após a incubação da placa com NBT, na concentração de 0,3 mg/ml, como mencionado anteriormente.

4.4 Ensaio Enzimáticos

Preparação das amostras

Para todos os ensaios enzimáticos as células foram tratadas como descrito anteriormente para os ensaios de viabilidade celular (item 4.2). Após tratamento, as células foram lavadas com 500 μ l PBS, posteriormente foram raspadas em 200 μ L de tampão de lise (1x), coletadas em microtubo e sonicadas (Potência Média por 10 seg, Sonicador 78HW-1 BIOMIXER). As células foram centrifugadas sob refrigeração (14000xg à 4°C, respectivamente). O sobrenadante foi estocado em -20°C. As atividades enzimáticas foram avaliadas no através de ensaios com o sobrenadante coletado.

Para quantificação dos níveis de glutatona, as amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético (TCA, 15%) por 20 minutos no *Thermo-shaker* à 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 6000 rpm. O sobrenadante foi coletado em microtubos e armazenados à -80°C.

4.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Para análise da atividade da SOD, foi utilizado o método descrito por Malstrom *et al*, (1975). Concentrações conhecidas de SOD (0 – 200 U/ml) ou amostras em tampão fosfato contendo 1,0 mM de hipoxantina, são adicionadas em 200µl do cromógeno NBT (0,5 mM). A reação enzimática é iniciada com a adição de 20µl de xantina oxidase (0,25 U/ml) que libera o O_2^- na reação. O resultado colorimétrico é quantificado em espectrofotômetro usando o comprimento de onda 450 nm.

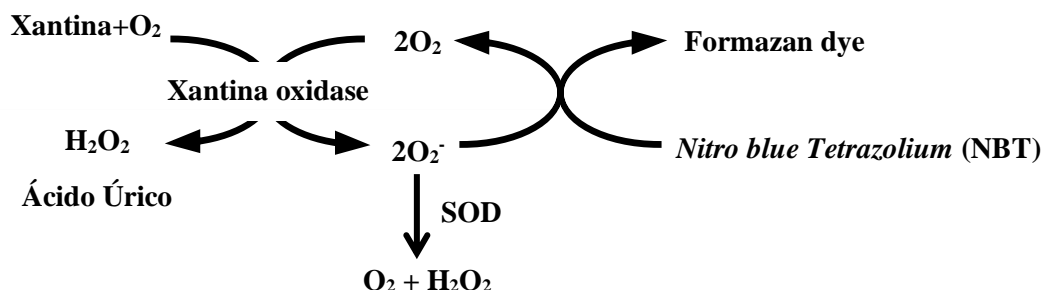
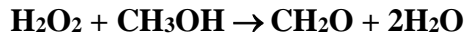


Figura 5. Modelo esquemático da atividade da superóxido dismutase. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O NBT compete com a SOD para a produção do formazan.

4.4.2 Catalase (CAT)

O ensaio consiste, primeiramente, na reação da amostra com metanol, tampão de ensaio e peróxido de hidrogênio (35,28mM) por 20 minutos. Posteriormente, a reação é parada com hidróxido de potássio (10M), para o acréscimo de pulpald (34.2 mM) por 10 minutos. E por fim, a adição de periodato de potássio por 5 minutos. A leitura é feita em espectrofotômetro a 540 nm.



Esquema 4. Modelo esquemático da atividade peroxidativa da catalase.

4.5 Quantificação de Glutathiona Total

Para quantificar a glutathiona total (GSH e GSSG), será utilizado o método descrito por Akerboom *et al*, (1981). A técnica consiste na reação da amostra com a solução de trabalho (Fosfato de potássio, EDTA, DTNB e glutathiona redutase) por 5 minutos, onde 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) é continuamente reduzido para 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB). Esta redução é decorrente da formação de GSSG que é reciclado por 6 U/ml da enzima glutathiona redutase e NADPH (0,84 mM). A leitura é feita em espectrofotômetro por 5 vezes, de 1 em 1 minuto no comprimento de onda de 412 nm.



Esquema 5. Quantificação dos níveis de glutathiona. O cromógeno DTNB é reduzido a TNB pela ação enzimática da Glutathiona Redutase.

4.7 Quantificação De Proteína Total

Para análise de proteínas totais das amostras e a expressão dos resultados de atividades enzimáticas em unidades por miligrama de proteína (U/mg proteína), utilizamos o método proposto por Bradford (1976), onde se utilizou 250µl do cromógeno (0,1 mg/ml de azul brilhante de coomassie G, preparada em 5% Metanol e 8,5% ácido fosfórico) que reagiu com 5µl de concentrações conhecidas de albumina de soro bovino – BSA (0 – 2mg/ml) para a obtenção de uma curva padrão. A leitura foi feita por espectrofotometria com absorvância máxima de 595 nm.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão das amostras (n=4) usando o programa *Microsoft Excel (2007)*. Para análise estatística utilizou-se o programa *Biostat 5.0*, verificando a análise de ONE WAY ANOVA, seguido do *pós-teste de Tukey*. Todos os testes estatísticos consideraram probabilidade (p-valor) significativa quando $\leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Viabilidade Celular após tratamento com AK

Para avaliar a possível citotoxicidade do AK em células da glia de Müller, incubamos em diferentes concentrações por um período de 24 horas. Os resultados obtidos mostraram que não houve diminuição da viabilidade celular, quando comparado com o grupo controle (sem tratamento), indicando ausência de citotoxicidade, porém, o grupo controle positivo, tratado com 500 ng/ml de LPS, se mostrou tóxico (Figura 6).

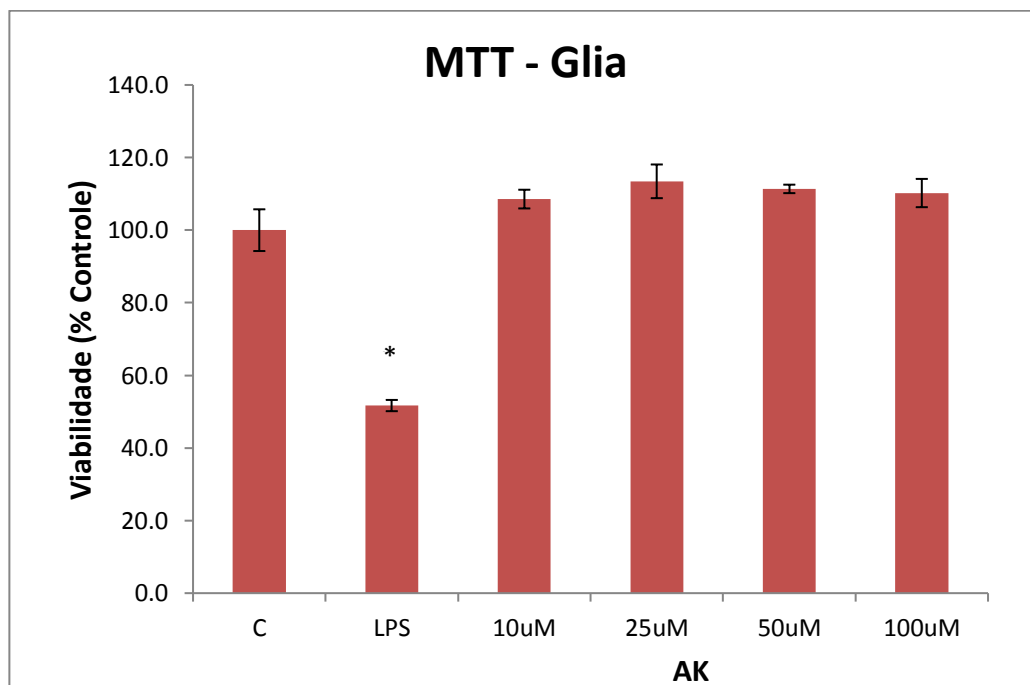


Figura 6. Análise da citotoxicidade do AK pela técnica do MTT. Foram avaliadas em células de Müller sem tratamento (Controle: C), tratados com diferentes concentrações

de AK (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) e o controle positivo tratado com 500ng/ml de LPS. n=4. * $P \leq 0,05$ vc controle. (ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.2 Viabilidade Celular após tratamento com LPS

Para avaliar a citotoxicidade do LPS em células da glia de Müller, incubamos em diferentes concentrações por um período de 24 horas. Os resultados obtidos mostraram que em todas as concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 500 ng/mL) de LPS ocorre a diminuição da viabilidade celular (14%; 17,9%; 23,2%; 40,78% e 93%, respectivamente), indicando que em todas as concentrações testadas o LPS é citotóxico para as células de Müller (Figura 7).

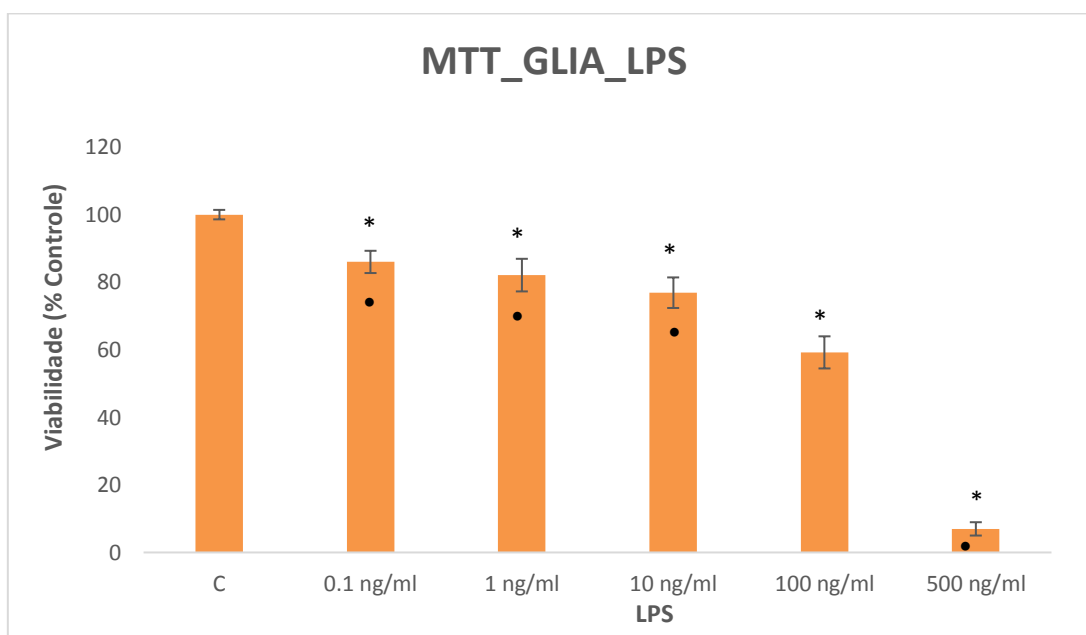


Figura 7. Análise da citotoxicidade do LPS pela técnica do MTT. Foram avaliadas em células de Müller sem tratamento (Controle: C) e tratados com diferentes concentrações de LPS (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml e 500 ng/ml) por 24 horas. A atividade foi estimada pela viabilidade celular em relação ao controle. n=4. * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo controle e • $P \leq 0,05$ comparado com 100ng/ml. (ANOVA, pós-teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

5.3 Análise da citotoxicidade do LPS após pré-tratamento com AK

Para verificar uma possível atividade protetiva do AK em resposta a citotoxicidade causada por LPS, incubamos as células da glia de Müller com AK na concentração de 100 μ M por 6 horas, posteriormente acrescentamos diferentes concentrações de LPS (100 ng/ml e 500 ng/ml) completando o período de 24 horas). Os resultados obtidos mostraram que em ambas as concentrações de 100 ng/ml e 500 ng/ml de LPS ocorreu diminuição da viabilidade celular (55,8% e 92,9% respectivamente) comparados com o grupo controle. Porém, quando esses mesmos grupos foram pré-tratados com AK, apresentaram um aumento importante na viabilidade celular de 39.1 % e 30.17%, respectivamente. Esses resultados indicam que grupos pré-tratados com AK protegem as células tratadas com LPS (Figura 8).

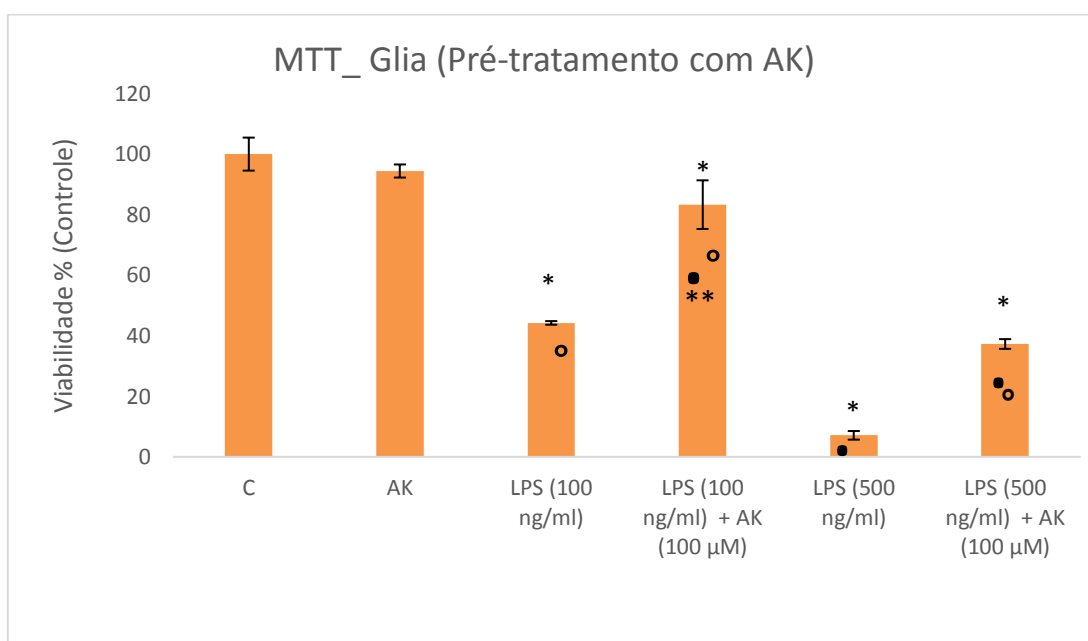


Figura 8. Análise da atividade protetora do AK em resposta a citotoxicidade causada por LPS através da técnica do MTT. Foram avaliadas as células de Müller sem tratamento (Controle: C); grupos tratados com 100 μ M de AK; Grupos tratados com LPS (100 ng/ml e 500 ng/ml) e grupos pré-tratados inicialmente com AK (100 μ M) por 6 horas, posteriormente tratados com LPS (100 ng/ml e 500 ng/ml) totalizando um período de 24 horas. A atividade foi estimada pela viabilidade celular em relação ao controle. n=4.

* $P \leq 0,05$ vs controle; ** $P \leq 0,05$ vs AK; • $P \leq 0,05$ vs 100 ng/ml ° $P \leq 0,05$ vs 500 ng/ml.
(ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.4 Quantificação De Espécies Reativas De Oxigênio Por Espectrofotometria

Para analisar a possível ação do AK em células de Muller, verificamos a produção de EROs após o tratamento dessas células com AK e LPS, nas mesmas condições anteriores. As análises das espécies reativas de oxigênio foram quantificadas após incubação da placa com NBT, na concentração de 0,3 mg/ml.

Os dados da figura 9 mostram que as células de Müller tratadas com AK, por 24 horas, aumentaram significativamente a produção de EROs em todas as concentrações testada: 10, 25, 50 e 100 μM (74,8%; 79,7%; 87,5% e 86,5%, respectivamente), quando comparadas com o grupo controle. Além disso, a concentração de 10 ng/ml de LPS, foi suficiente para induzir atividade nessas células, apresentando um acúmulo de EROs (212%), em relação ao grupo controle, portanto AK foi menos eficaz em aumentar o acúmulo de EROs.

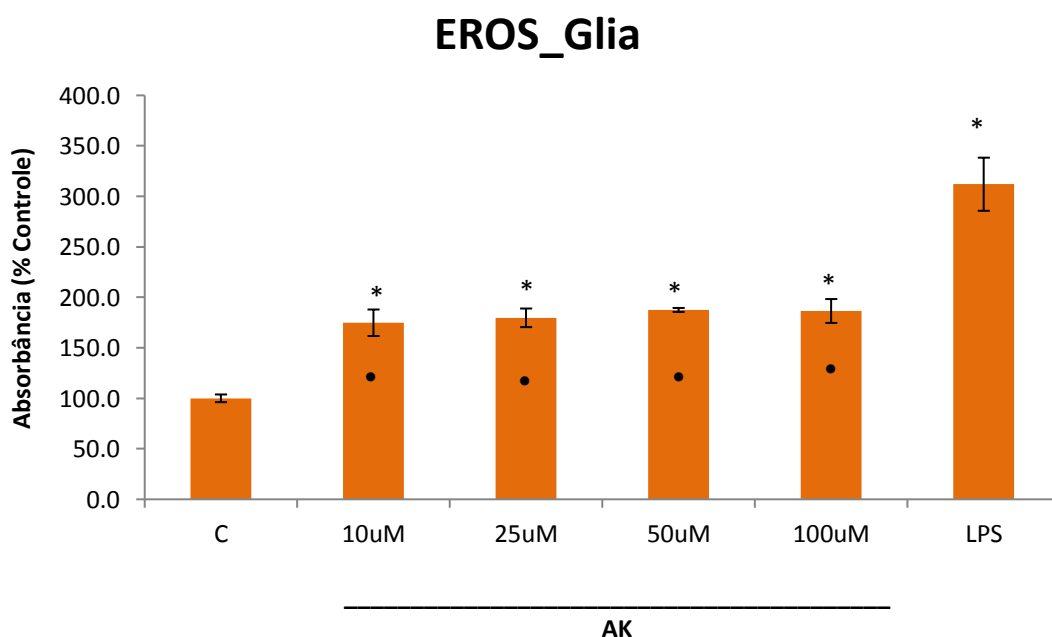


Figura 9. Produção de EROs por AK. A análise da quantificação de EROs foi avaliada em células de Müller sem tratamento (Controle: C), tratados com LPS (100 ng/ml) e

tratados com diferentes concentrações (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) de AK. A atividade foi estimada em porcentagem de absorbância. (P-valor) \leq 0,05 em relação ao grupo controle. Os resultados de cada grupo foram obtidos de amostras com n=4. * P \leq 0,05 vs controle; • P \leq 0,05 vs LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey). Tempo 24 horas.

5.5 Quantificação De Espécies Reativas De Oxigênio Por Espectrofotometria em células de Glia de Müller tratadas com Apocinina

Como AK e LPS aumentam o acúmulo de EROs, fomos verificar o possível envolvimento da NADPH oxidase na geração desses radicais. Para isso comparamos a ação da apocinina, conhecida por inibir NADPH oxidase na geração de EROs. Os dados da figura 10 mostram que as células de Müller tratadas com 100 μ M de AK por 24 horas aumentaram significativamente a produção de EROs (86.22%), quando comparadas com o grupo controle. Além disso, a concentração de 100 ng/ml de LPS, foi suficiente para induzir um grande acúmulo de EROs nestas células (391.5%). A apocinina (50 μ M) per se foi capaz de inibir em 18.9% a produção EROs, inclusive no grupo controle e inibiu totalmente o aumento induzido por 100 ng/ml de LPS e 100 μ M de AK. Observamos também que AK na concentração de 100 μ M foi capaz de inibir em 50% o aumento no acúmulo de EROs induzido por 100ng/ml de LPS. Dessa forma, AK e LPS foram efetivos para induzir a atividade oxidante de culturas de células de Müller após 24 horas de tratamento, porém, quando co-tratados, os grupos apresentam uma significativa diminuição de EROs. Já os grupos co-tratados com AP, apresentou uma diminuição significativa em todos os grupos.

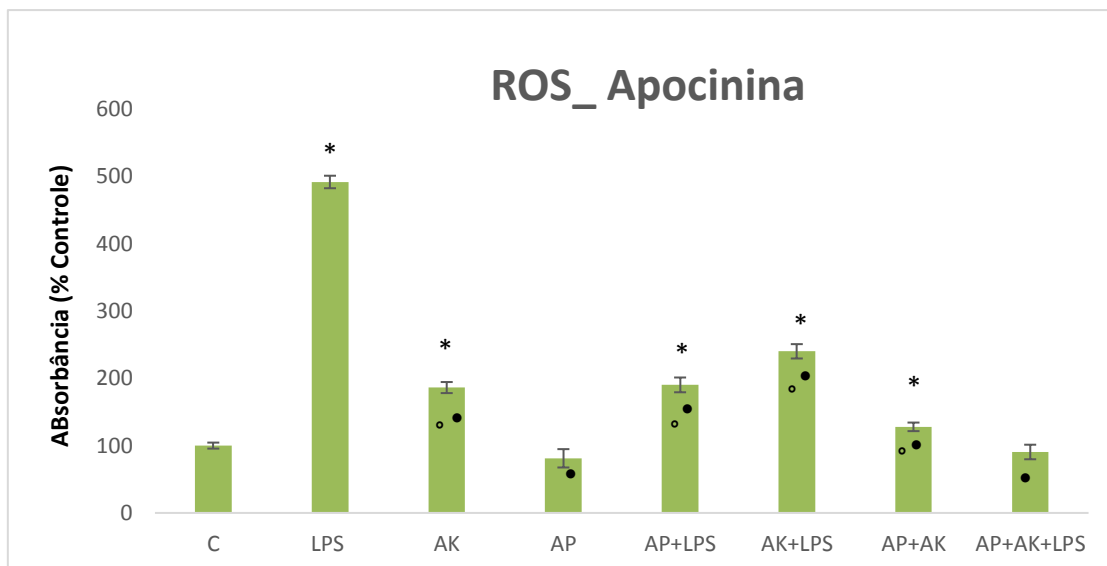


Figura 10. Produção de EROs após tratamento com apocinina. A análise da quantificação de EROs foi avaliada em células de Müller sem tratamento (Controle: C), tratados com LPS (100 ng/ml), tratados com AK (100 μ M), apocinina (50 μ M). Co-tratados: AP,AK e LPS; AP e LPS; AK e LPS; AP e AK. A atividade foi estimada em porcentagem de absorbância. Os resultados de cada grupo foram obtidos de amostras com n=4. * $P \leq 0,05$ vs controle; ° $P \leq 0,05$ vs AK; • $P \leq 0,05$ vs AP (ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.6 Atividade da Superóxido Dismutase

Com o intuito de analisar o perfil antioxidante enzimático durante o acúmulo de EROs pelo AK, avaliamos a atividade da SOD após as células de Müller de embriões de galinha serem submetidas ao tratamento com 100 μ M de AK por 24 horas em meio de cultura DMEM. Além disso, fomos analisar o possível bloqueio da atividade antioxidante do AK, as células de Muller foram pré-tratadas com 100 μ M de AK por 6 horas e posteriormente estimuladas com 10 ng/ml de LPS completando o tempo de 24 horas de estímulo.

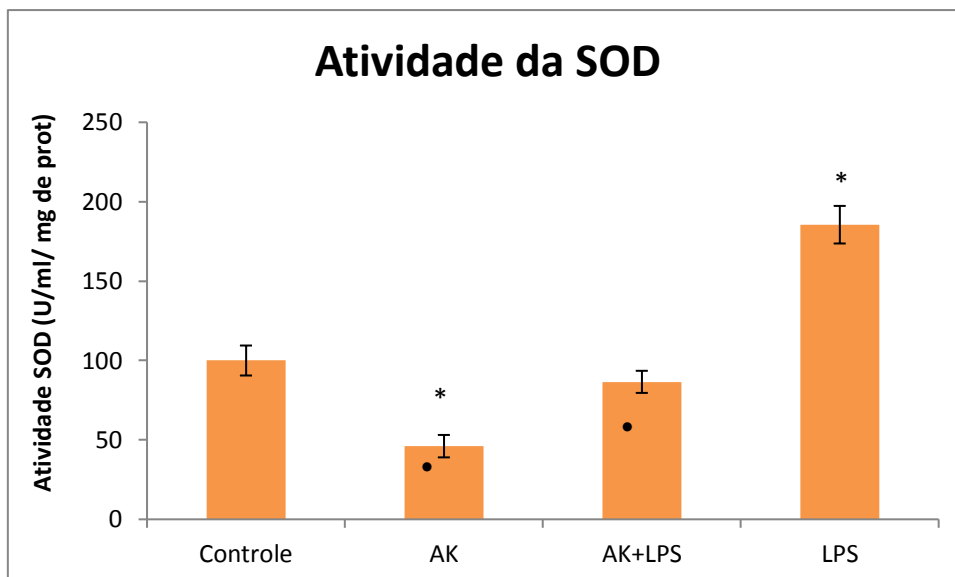


Figura 11. Atividade antioxidante da SOD em células de células de Müller tratadas com AK. A atividade da SOD foi avaliada em células de Müller sem tratamento (Controle) ou tratados com LPS (10 ng/ml), AK (50 μ M) ou co-tratadas com AK por 6 horas para então serem estimuladas com LPS, nas mesmas condições anteriores. A atividade da SOD foi estimada em unidade por ml de cada micrograma de proteína de amostra utilizada. Os resultados de cada grupo foram obtidos de amostras com n=4. * $P \leq 0,05$ vs controle; • $P \leq 0,05$ vs LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Os resultados apresentados na figura 11 mostraram que o grupo tratado com AK apresentou uma significativa diminuição de 54% na produção de SOD quando comparado com o grupo controle. Células tratadas com 10ng/ml de LPS mostrou um considerável aumento de 83% comparado ao grupo controle. Porém no grupo pré-tratado com AK por 6 horas e posteriormente tratados com 10 ng/ml de LPS, AK bloqueou completamente o aumento na atividade da enzima induzida por LPS.

5.7 Atividade Enzimática da Catalase

Para análise do perfil antioxidante enzimático da enzima CAT, as células foram submetidas ao tratamento com 50 μ M AK por 24 horas, nas mesmas condições anteriores para a atividade enzimática da SOD.

O ensaio apresentou uma prevenção estatisticamente significativa da atividade enzimática da CAT no grupo tratado com 50 μ M AK (47.5%), quando comparado com o grupo controle. Semelhante como observado pela atividade da SOD, o grupo tratado com

LPS (10 ng/ml) induziu um aumento significativo de 276.9% de CAT, justificando o acúmulo de EROs.

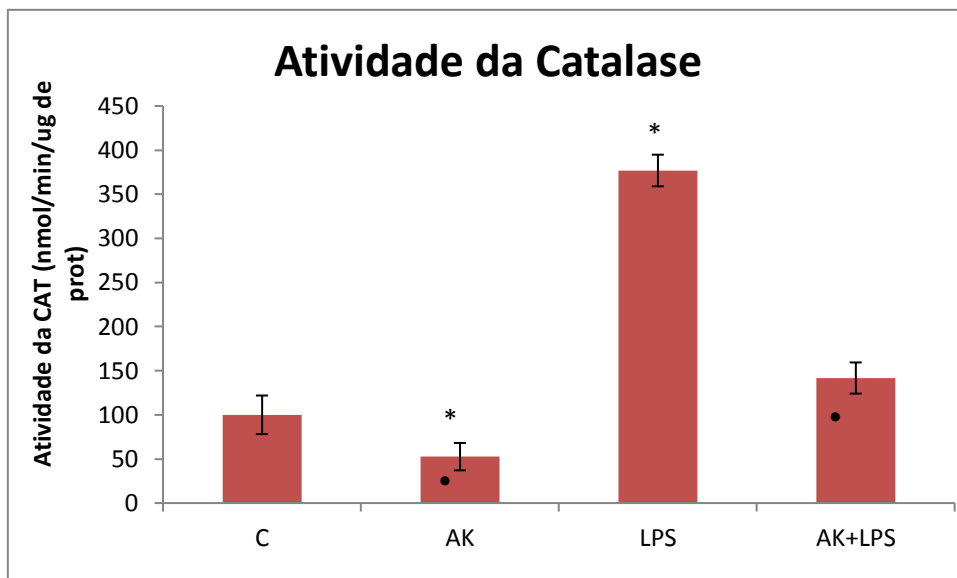


Figura 12. Atividade antioxidante da Catalase em células de células de Müller tratadas com AK. A atividade peroxidase de CAT foi avaliada em células de Müller sem tratamento (Controle) ou tratados com LPS (10 ng/ml), AK (50 μ M) ou pré-tratadas com AK por 6 horas para então serem estimuladas com LPS, nas mesmas condições anteriores. A atividade da CAT foi estimada nmol por minuto de micrograma de proteína de cada amostra. Os resultados de cada grupo foram obtidos de amostras com n=4. * $P \leq 0,05$ vs controle; • $P \leq 0,05$ vs LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.8 Níveis de Glutathiona Total

Para verificar o perfil antioxidante via glutathiona peroxidase perante o estresse oxidativo após tratamento com AK, verificamos os níveis de glutathiona total nas células de Müller de embriões de galinha submetidos ao tratamento com 50 μ M AK por 24 horas em meio de cultura DMEM, nas mesmas condições anteriores para a atividade enzimática da CAT. Os resultados da figura 13 demonstram que o grupo tratado com 50 μ M de AK apresentou uma diminuição de 89.7% dos níveis de glutathiona total, quando comparados com o grupo controle (sem tratamento). Da mesma forma, como observado pela atividade da Catalase e da SOD, o estímulo com LPS induziu aumento dos níveis totais de

glutathiona (76.63%). No entanto, 50 μ M de AK foi capaz de diminuir os níveis de glutathiona quando comparado ao grupo controle e para o grupo tratado com LPS.

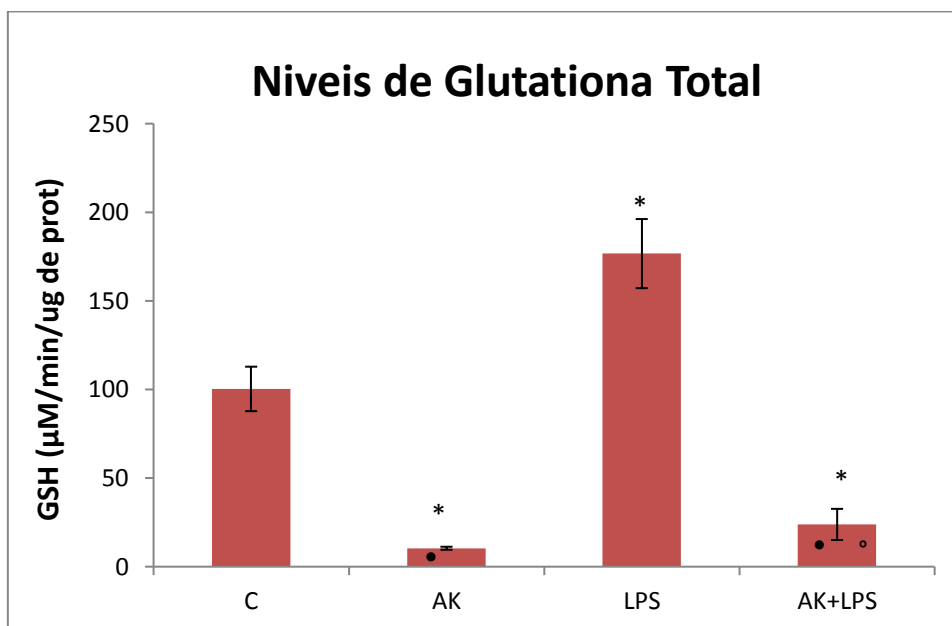


Figura 13. Níveis Totais de Glutathiona em células de células de Müller tratadas com AK. Os níveis totais de Glutathiona foram avaliados em células de Müller sem tratamento (Controle) ou tratadas com LPS (10ng/ml), AK (50 μ M) ou pré-tratadas com AK por 6 horas para então serem estimuladas com LPS (AK+LPS), nas mesmas condições anteriores. A atividade foi estimada em porcentagem do controle da concentração de glutathiona obtida por micrograma de proteína de cada amostra (% de GSH/min/ μ g de proteína). Os resultados de cada grupo foram obtidos de amostras com n=4. * $P \leq 0,05$ vs controle; ° $P \leq 0,05$ vs AK; • $P \leq 0,05$ vs LPS (ANOVA, pós-teste de Tukey).

6. Discussão

A cultura de células glial de Müller de embrião de galinha constitui um modelo experimental bastante útil para estudos na área de neurociências devido ao fato de ser uma parte do sistema nervoso central (SNC) que compartilha a mesma origem embrionária e segue os mesmos padrões de desenvolvimento do cérebro. A retina tem sido amplamente utilizada em pesquisa, pois é um modelo que compreende os mecanismos de proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento inicial do SNC em vertebrados (Sánchez-Sánchez, 2010).

A produção de EROs tem sido implicado na morte celular e sua formação é o elo final comum para toxicidade de uma variedade de afecções neurodegenerativas agudas e crônicas. Os neurônios do SNC possuem uma baixa capacidade regenerativa celular quando comparado a outros órgãos (Andersen, 2004), além de serem mais propensos a danos causados por EROs, devido muitos neurotransmissores serem oxidáveis, possuir muitas quantidades de ferro, os lipídios das membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados e o alto consumo de oxigênio no SNC (Barbosa, 2006). Na retina, dano oxidativo está relacionado com a patogênese de diversas doenças oculares como glaucoma, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada a idade, entre outros. O conhecimento e o tratamento dessas afecções são somente parcialmente entendidos. A produção de EROs também está associada com a defesa imune inata e participa da atividade de células com propriedades fagocíticas, como as células de müller na retina, que uma vez ativadas, liberam uma variedade de fatores, que agem para regular a neurotoxicidade de neurônios e assim proteger a sua sobrevivência. (Liu et al., 2002, Wu et al. de 2002 e Kremlev et al., 2004).

O LPS é um dos componentes imunoestimulantes melhor estudado de bactérias e se encontra na membrana exterior de bactérias do tipo gram-negativas. O LPS é um importante estimulador para a produção de EROs, pois quando este se liga ao seu receptor de membrana, induz uma cascata de quinases. Com a ativação da via que produz EROs, o sistema antioxidante se ativa buscando equilibrar essas espécies reativas. O LPS, quando reconhecido pelo seu receptor de membrana TLR4, desencadeia a ativação de diferentes vias de sinalização, como do MAPK, AP-1 e NF κ B, posteriormente promove a biossíntese de diversos mediadores inflamatórios (Raetz & Whitfield, 2002). Neste trabalho, o LPS foi utilizado com o objetivo de promover um modelo de inflamação nas células enriquecidas de Glia.

O 5-hidroxi-2-hidroxi- γ -pirona (AK) é um metabólito proveniente de fungos que tem demonstrado ser um potente ativador de macrófagos por diferentes mecanismos que favorecem o acúmulo de EROs citoplasmático (Rodrigues, et al., 2011). Estudos na literatura relatam que o AK promove atividade inibitória da tirosinase, porém o mecanismo de inibição desta enzima ainda é contraditório. Estudos prévios sugerem que este mecanismo é decorrente do possível papel quelante do AK, sugerindo possível inibição da enzima tirosinase por depender dos íons cobre como cofator de sua atividade (BATISTUZZO et al, 2002). Neste estudo, o AK é a droga utilizada para a produção de

EROs, para verificar sua atividade protetora no modelo de inflamação celular promovido pelo tratamento com LPS.

A viabilidade celular (figura 6) não apresentou declínios quando comparada ao grupo controle (sem tratamento), mostrando que as concentrações de AK utilizadas neste trabalho (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) não se mostraram tóxicas para as células em nenhuma das concentrações testadas nessa população celular retiniana. Esses dados são similares ao encontrado em macrófagos e neutrófilos (Rodrigues et al, 2011), mostrando que AK nas concentrações testadas não afetam a viabilidade celular.

Os tratamentos com LPS buscaram avaliar se este apresentava toxicidade e, assim, um modelo inflamatório propício para avaliar a ação protetiva do AK. Assim, todas as concentrações utilizadas (0.1, 1, 10, 100 e 500 ng/ml), apresentaram citotoxicidade nas células de Müller (14%, 17.9%, 23.2%, 40,78% e 93%, respectivamente). Assim, como houve uma considerável baixa na viabilidade causada por LPS nas concentrações de 100 e 500 ng/ml, passamos a utilizar tais concentrações com o objetivo de verificar se um pré-tratamento com AK alteraria esta citotoxicidade.

Assim, verificamos que o pré-tratamento com AK antes do tratamento com LPS (Figura 8), e os resultados mostraram quem em ambas as concentrações de LPS (100 e 500 ng/ml), apresentaram uma morte acentuada (55.8% e 92.9%, respectivamente), provavelmente por apoptose. Porém, nos grupos pré-tratados com AK, na concentração de 100 μ M, posteriormente tratados com LPS nestas mesmas concentrações, pode se observar uma proteção celular promovida por AK. Sugerimos que o AK pode alterar a via IKK, uma vez que o seu análogo (5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methyl-6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate (MHNC), inibiu a resposta inflamatória através da supressão de Syk/Src e a ativação de NF- κ B (Dung, 2014).

O LPS é uma molécula altamente tóxica responsável pelas mais variadas manifestações tóxicas, dentre elas, o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de EROs no ambiente celular (Machado, 2010). Como o resultado na figura 8 mostrou a capacidade do AK em proteger contra a citotoxicidade causada por LPS, buscamos verificar se o AK alteraria o acúmulo de EROs nas células de Müller. Na figura 9, podemos observar que as concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ M de AK apresentou significativo acúmulo de EROs nas células. Porém, quando as células foram co-tratadas com LPS, apresentaram uma diminuição no acúmulo de EROS (Figura 10). Vimos também que todos os grupos

co-tratados com apocinina, um dos mais seletivos inibidores do complexo NADPH oxidase (Stefanska, 2010), apresentaram níveis significativamente baixos no acúmulo de EROs, quando comparados com o grupo tratado com LPS. O AK quando co-tratado com LPS e apocinina, apresentou uma sinergia na prevenção do acúmulo de EROs quando comparado com o grupo LPS e apocinina.

O organismo possui sistemas naturais de eliminação de EROs, tais com a atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-PX. Como já vimos, A figura 9 mostrou que as concentrações supracitadas de AK foram eficientes para promover alterações no perfil oxidativo das células de Müller, porém a figura 10 demonstrou uma atenuação deste acúmulo quando co-tratados com LPS, AK ou ambos. Buscamos então verificar se o AK alterava os níveis da atividade das enzimas antioxidantes.

Mediante este perfil oxidativo pelo acúmulo de EROs, verificamos o balanço da resposta celular pela mensuração das atividades antioxidantes enzimáticas da SOD, CAT e dos níveis totais de Glutathione após o tratamento com AK, (figura 11, 12 e 13). Nossos resultados mostraram que o AK induziu inibição da atividade de SOD (53.9%), Catalase (47.5%) e os níveis totais de Glutathione (89.7%), quando comparado ao grupo controle. LPS como esperado foi capaz de induzir um aumento expressivo dessas enzimas e nos níveis de glutathione. Porém, quando verificamos nos grupos co-tratados com AK e LPS, vimos uma inibição parcial nas atividades induzidas por LPS e inibição total nos níveis de Glutathione (figura 11, 12 e 13). Para estes, o AK induziu inibição da atividade de SOD (14%), Catalase (10.39%) em comparação ao grupo controle (100%) e os níveis de Glutathione (47.97%) já que este se manteve semelhante ao controle (100%) mesmo após as células tratadas com AK serem estimuladas com LPS, que sozinho, como esperado, mostrou aumento expressivo na atividade de Catalase, SOD e produção de Glutathione.

Desta forma, os dados sugerem que o AK pode estar contribuindo para o acúmulo de EROs mediante inibição da resposta antioxidante celular endógena a níveis posteriores a produção de EROs e anteriores da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), substrato comum para atividade da catalase e glutathione peroxidase. Dessa forma, podemos inferir que a diminuição da atividade enzimática de Catalase e os baixos níveis de Glutathione total ocorram possivelmente pelo comprometimento da atividade de SOD, primeira enzima da cascata antioxidante enzimática, acarretando em baixa produção de H₂O₂, produto da SOD e substrato para a Catalase e Glutathione Peroxidase,

comprometendo o perfil antioxidante celular. O AK pode estar controlando a atividade de SOD por ser um possível quelante de íons, como o Cu^{+2} , apontando a hipótese de que este metabólito possa quelar também Mn e/ou Zinco (Zn), cofatores essenciais para a atividade de SOD1 (Cu-Zn-SOD) e SOD 2 (Mn-SOD).

Concluindo, é possível que os efeitos protetivos do AK em culturas enriquecidas de células de Muller e tratadas com LPS ocorra principalmente por competição entre LPS e AK, já que AK diminui bastante a atividade da enzima induzido por LPS. Consideramos também que EROs produzidos por AK estão abaixo do acúmulo necessário para produzir citotoxicidade nessas células.

7. Considerações Finais

Os Resultados obtidos neste trabalho mostram que o AK não apresenta citotoxicidade para as células da glia de Müller e que o LPS apresenta um modelo infamatório em células de glia de Müller. O Ak apresentou significativa atividade contra a inflamação causada por LPS e que pode vir a agir na alteração da via IKK, impedindo a ativação de NF- κ B. Por fim, vimos que o AK também alterava o balanço antioxidante enzimático, diminuindo os níveis da atividade da SOD, CAT e dos níveis totais de glutathiona.

8. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation , Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 2766–2778, 2010.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, 77, 373-382, 1981.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 4, n. July, p. 88–88, 2004.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nat. Med.**, v. 10, p. S18-25, 2004.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. Nf- κ B: Ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–19, 1996.

BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios. v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARRA, K. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios
Oxidative stress : concept , implications. v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BATISTUZZO, J. A.O.; ITAYA, M.; ETO, YUKIKO. **Formulário Médico Farmacêutico**, 2º Edição, São Paulo, Tecnopress, 2002.

BAURIN, N. et al. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2–3, p. 155–158, 2002.

BENTLEY R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Nat Prod Rep**; 23:1046–62, 2006.

BLUMENTHAL CZ. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regul Toxicol Pharmacol**. 39:214–28; 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289–303, maio. 2013.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P; SKATCHKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Müller Cells In The Healthy And Diseased Retina. **Prog Retin Eye Res.** 25(4):397-424, 2006.

Bringmann, A.; Reichenbach, A.; Wiedemann, P. Pathomechanisms Of Cystoid Macular Edema. **Ophthalmic Res.** 36(5): 241-9, 2004.

BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.** 11:341–346, 2011.

CHANG T. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci**, 10:2440–75, 2009.

CHOI, D. CELL, P. D.; CRISTO, A. C.; The Role of NADPH Oxidase 1 – Derived Reactive Oxygen. v. 11, n. 9, 2009.

Conselho Brasileiro de Oftalmologia. O Olho Humano. Disponível em: <http://www.cbo.com.br/novo/publico_geral/o_olho_humano>. Acesso em 05 de Maio de 2017.

CRUZ-MACHADO, S. D. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFK β . **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

DUNG, T. T. M. et al. (5-Hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methyl 6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF- κ B activation. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2014.

DYER, M. A.; CEPKO, C. L. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. p. 873–880, 2000.

EMAMI S, et al. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorg Med Chem**;17:45–8, 2007.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

GOMES AJ, LUNARDI CN, GONZALEZ S, TEDESCO AC. The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res**;34: 1487–94, 2001.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Krishna*, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–5, 2009.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edn, Oxford University Press, NY. 1999.

HAYES, S.; BRANDEN, N.R.; BUCKINGHAM, B.; REH, T.A. Notch Signaling Regulates Regeneration In The Avian Retina. **Dev. Biol.** 312, 300–311, 2007.

HUBER, P. C. Revisão. v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

JOHANSSON, L.H. AND BORG, L.A.H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Anall. Biochem.** 174, 331-336, 1988.

JOHNSON JB, SUMMER W, CUTLER RG, MARTIN B, HYUN DH, DIXIT VD, et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. **Free Radic Biol Med.** 42(5):665-74. 2007.

KAWASAKI, A., OTORI, Y., BARNSTABLE, C.J. Müller cell protection of rat retinalganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 41, 3444–3450, 2000.

KOLB, H. The neural organization of the human retina: Principles and Practices of Clinical Electrophysiology of Vision. Eds. Heckenlively, J.R. and Arden, G.B. **Mosby Year Book Inc.**, St. Louis, 1991. pp. 25-52.

KREMLEV, S.G., ROBERTS, R.L., PALMER, C. Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. **Journal of Neuroimmunology** 149, 1–9, 2004.

LÁSZLÓ G. Catalase Deficiency and Type 2 Diabetes. v. 31, n. 12, p. 2008, 2008.

LEITE, H., and SARNI, R. (2006) Radicais livres, anti-oxidantes e nutricao. *Soc. Bras. Nutr. Parenter. e Enter.* [online] <http://www.sbnpe.com.br/radicais-livres-antioxidantes-e-nutricao>.

LESNEFSKY, E. J., MOGHADDAS, S., TANDLER, B., KERNER, J., And HOPPEL, C. L. J. Mol. Cell. **Cardiol.** 33, 1065–1089, 2001.

LI, Y. et al. A novel and green synthesis of kojic acid derivatives in ionic liquid [bmim]BF₄. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 52, p. 7147–7150, dez. 2013

LIM JTE. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatol Surg**; 25:282–4, 1999.

LIMA, C. R. et al. Combined kinetic studies and computational analysis on kojic Acid analogous as tyrosinase inhibitors. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 7, p. 9591–605, 2014.

MALMSTROM, B., ANDREASSON, L., AND REINHAMMAR, B.: **The Enzymes, 3rd Ed. Vol. 12**, P. Boyer, Academic Press, NY, 533, 1975.

MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox biology**, v. 2, p. 308–13, jan. 2014.

MARTINS, R. A. P.; PEARSON, R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. v. 92, 2007.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1–3, p. 83–104, 16 nov. 2000.

MCGILLEM, G.S. et al. Antigenic changes of rabbit retinal Muller cells in culture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 39, 1453–1461, 1998.

MI HA YM, CHUNG SW, SONG S, LEE H, SUH H, CHUNG HY. 4-(6-Hydroxy- 2-naphthyl)-1,3-benzendiol: a potent new tyrosinase inhibitor. **Biol Pharm Bull** 2007;30:1711–5.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD- **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 186–192, 2004.

MOTO M, MORI T, OKAMURA M, KASHIDA Y, MITSUMORI K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Arch Toxicol**;80:299–04, 2006.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

NOHL, H., GILLE, L., KOZLOV, A.V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. **Free Radic. Biol.Med.** 25, 666–675; 1998.

NOHYNEK GJ, KIRKLAND D, MARZIN D, TOUTAIN H, LECLERC-RIBAUD C, JINNAI H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-hydroxymethyl)-4H-pyran-4- one]. **Food Chem Toxicol**;42:93–105, 2004.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2002.

REIS, R. A. M. et al. Müller glia factors induce survival and neuritogenesis of peripheral and central neurons. **Brain research**, v. 1205, p. 1–11, 18 abr. 2008.

RHEE, S.G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, **Science** 312, 1882–1883, 2006.

RIETSCHER, E. T et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 2, p. 217–225, 1994.

Robinson Sr, Dreher Z. Müller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development. **J Comp Neurol**. 292:178–192, 1990.

RODRIGUES, A. P. D. et al. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. v. 35, p. 335–343, 2011.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. V et al. Wnt signaling has different temporal roles during retinal development. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 239, n. 1, p. 297–310, jan. 2010.

Santos AS, Silva EO, Nascimento JLM, Alves CN, Carvalho ASC, et al. (2010) Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-c-pyrone as a macrophage activation agent to combat cutaneous leishmaniasis. **European patent** WO2010017613.

SARTHY, V.; Ripps, H. The retinal Müller Cell. **Kluwer Academic/ Plenum Publishers**, New York. 2001.

SIMMONS, K. T. et al. Inflammatory Response to Lipopolysaccharide on the Ocular Surface in a Murine Dry Eye Model. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 57, n. 6, p. 2443–2451, 2016.

TAMURA T., et al. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**; 222:213–24, 2006.

TANAKA, T. et al. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 β expression in glial cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2013.

TEIXEIRA, I.; OLIVEIRA, D. A.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives. p. 2845–2857, 2010.

TREIBER ET AL. Accelerated aging phenotype in mice with conditional deficiency for mitochondrial superoxide dismutase in the connective tissue. **PubMed**. 2011.

TUIN, A.; VLAG, A. H. DER. Chapter 3 On the role and fate of LPS- dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology**, v. 290, n. 2, p. G377-85, 2006.
Rietschel

VEAL, E. A; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular cell**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 13 abr. 2007.

WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 747–757, 2004.

WRIGHT, S. D. Toll1, a new piece in the puzzle of innate immunity. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 4, p. 605–609, 1999.

SENDOVKI, M., et al. Fishman First Structure of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. **Journal of Molecular Biology**. 405 (1):227-237, 2001.

OLSON, K. R. Forum Review. **Analytical Chemistry**, v. 7

OKAMURA, T. et al. Kinetics and metabolism of apocynin in the mouse brain assessed with positron-emission tomography. **Phytomedicine**, 2017.

Y. Niwa and H. Akamatsu, “Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation,” *Inflammation*, vol. 15, no. 4, pp. 303–315, 1991

LEFEVERE, E. et al. Mitochondrial dysfunction underlying outer retinal diseases. **Mitochondrion**, v. 36, p. 66–76, 2017.