

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – CCQFA**

**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção**



**Dissertação**

**Efeito do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona  
em parâmetros neuroinflamatórios em cultura primária de astrócitos de ratos  
expostas ao lipolissacarídeo**

**Fernando Lopez Alvez**

**Pelotas, 2021**

**Fernando Lopez Alvez**

**Efeito do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)thiazolidin-4-one  
em parâmetros neuroinflamatórios em cultura primária de astrócitos de ratos  
expostas ao lipopolissacarídeo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roselia Maria Spanevello

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayara Sandrielly Pereira Soares

Pelotas, 2021.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A314e Alvez, Fernando Lopez

Efeito do composto 3-(3-(dietilamino)propil)--  
-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona em parâmetros  
neuroinflamatórios em cultura primária de astrócitos de  
ratos expostas ao lipolissacarídeo / Fernando Lopez Alvez ;  
Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Mayara Sandrielly  
Pereira Soares, coorientadora. — Pelotas, 2021.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências  
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade  
Federal de Pelotas, 2021.

1. Tiazolidinonas. 2. Astrócitos. 3. Estresse oxidativo. 4.  
Neuroinflamação. 5. Acetilcolinesterase. I. Spanevello,  
Roselia Maria, orient. II. Soares, Mayara Sandrielly Pereira,  
coorient. III. Título.

CDD : 664

**Fernando Lopez Alvez**

**Efeito do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)thiazolidin-4-ona em parâmetros neuroinflamatórios em cultura primária de astrócitos de ratos expostas ao lipolissacarídeo**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 04/08/2021

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Roselia Maria Spanevello (Orientador)  
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



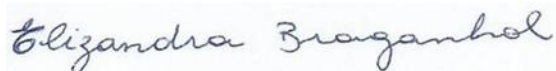
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Hofstätter Azambuja  
Doutora em Biociências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Elizandra Braganhol  
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



---

Dedico este trabalho à minha família e a todos  
que me apoiaram e me conduziram até aqui.

## Agradecimentos

Antes de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida, por todos aqueles que passaram na minha vida e por cada dia vivido.

Agradeço à minha mãe, Teresa, e à minha irmã, Marcela, por todo o apoio e amor, e por serem muitos *porquês* desta existência.

Agradeço à minha *mater* científica e orientadora, Professora Roselia, que é um farol que guia o meu navegar na ciência. Agradeço pela compreensão, carinho e oportunidade que me permitiram chegar até aqui e me mostraram que existem pessoas únicas e maravilhosas no universo da pós-graduação *strictu sensu*.

Despendo abundantes gratulações à minha outra *mater* científica e coorientadora, Mayara S., sem a qual esta faina homérica estaria deveras semota da sua completude. Também agradeço pelo carinho, paciência, esforço e pela pletora de ensinamentos ao longo desta jornada.

Agradeço à Natália Bona pela amizade, conversas, risadas, litros de café, pela ajuda neste projeto e por tantos ensinamentos sobre a ciência e sobre a vida. Certamente os experimentos, por vezes extenuantes, foram facilmente suportados pelo seu bom humor.

Agradeço à Nathalia Pedra pela amizade, pelo trabalho, pelos ensinamentos e por ter tido muita paciência com um mestando que tinha muita vontade de aprender sobre cultivo de células.

Agradeço à Professora Francieli S. e aos colegas dos laboratórios Neurocan e Biomarcadores – Bernardo M., Fernanda T., Julia M., Juliane C., Luiza S., Karina L., Vânia R., Alessandra S., Gabriela G., Kellen G., Olívia F. e Orlando F. – pois bons trabalhos requerem bons laboratórios e isso só é possível com bons cientistas que sejam boas pessoas também.

Agradeço também a todos os estudantes que fazem parte da iniciação científica do laboratório – Francieli, Sara, Juliane, Anita, Tayná e William – e que eu seja digno de ser pavimento para o trajeto científico de vocês.

Agradeço a meus amigos do efésios 4, Lucio, Raul, Balleste, Bernardo, Dérick, Hiago, Jacques, Julio, Cameu e Carlitos, com quem divido muito de minha vida e, agora, este trabalho.

Agradeço a João Cantaluppi pela amizade e pelas conversas filosóficas - literalmente.

“Now I am become death, the destroyer of worlds.”

- J. Robert Oppenheimer

## Resumo

Lopez, Fernando Alvez. **Efeito do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona em parâmetros neuroinflamatórios em cultura primária de astrócitos de ratos expostas ao lipopolissacarídeo**. 2021. Nº 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

Os astrócitos possuem múltiplos papéis importantes associados com a fisiologia do encéfalo. Entretanto, dependendo do estímulo, os astrócitos podem exacerbar as reações inflamatórias levando ao desenvolvimento e à progressão de doenças neurológicas. Nessa linha, terapias com os astrócitos como alvo representam uma área promissora no desenvolvimento de novos fármacos para o encéfalo. Tiazolidinonas são compostos heterocíclicos que possuem um átomo de nitrogênio e de enxofre e um grupo carbonila no anel e representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido às suas propriedades farmacológicas. O objetivo deste estudo foi o de investigar o efeito glioprotetor do composto 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27), na proliferação celular e morfologia, em parâmetros de estresse oxidativo, atividade das enzimas ectonucleotidases e acetilcolinesterase (AChE), e níveis de interleucina 6 (IL-6), em cultivo primário de astrócitos submetidos a um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS). O cultivo de astrócitos foi submetido a LPS (10 µg/ml) por 3h e subsequentemente tratados com o composto DS27 por 24 e 48h (na faixa de concentração de 10-100 µM). O LPS induziu um aumento na proliferação celular, atividade da AChE, níveis de IL-6, danos oxidativos e um aumento na hidrólise de ATP e ADP e redução na hidrólise ADP no cultivo primário de astrócitos de ratos. Nossos achados demonstraram que o DS27 é capaz de modular a sinalização purinérgica e colinérgica, o status redox e de citocinas pró-inflamatórias nos danos induzidos por LPS em astrócitos. Esses efeitos glioprotetivos do composto DS27 podem ser muito importantes para melhorar a neuroinflamação, que é associadas com doenças no encéfalo.

**Palavras-Chave:** Tiazolidinonas, astrócitos, estresse oxidativo, neuroinflamação, acetilcolinesterase, ectonucleotidases, interleucina 6.



## Abstract

Lopez, Fernando Alvez. **Effect of the 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one compound on neuroinflammatory parameters in rat astrocyte primary culture exposed to lipopolysaccharide.** 2021. N° 81p. Dissertation (Master Degree) – Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas.

Astrocytes have multiple important roles associated with brain physiology. However, depending of the stimuli, astrocyte may exacerbate inflammatory reactions leading to developmental and progression of neurological diseases. In this line, therapies targeting astrocytes represent a promising area to development of new brain drugs. Thiazolidinones are heterocyclic compounds that have a sulphur and nitrogen atom and a carbonyl group in the ring and represent a class of compounds of great scientific interest due to their pharmacological properties. The aim of this study was to investigate the glioprotective effect the compound 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one (DS27) in cell proliferation and morphology, oxidative stress parameters, activity of the enzymes ectonucleotidases and acetylcholinesterase (AChE) and interleukin 6 (IL-6) levels in primary astrocytes culture submitted to a model of neuroinflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). The astrocytes culture was exposed to LPS (10 µg/ml) for 3 h and subsequently treated with compound DS27 for 24 and 48 h (concentrations ranging to 10-100 µM). LPS induced an increase in astrocytes proliferation, AChE activity, IL-6 levels, oxidative damage, and an increase in ATP and ADP and reduction in AMP hydrolysis in rat primary astrocytes cultures. DS27 treatment was effective in to protect these alterations induced by LPS in astrocytes cells. Our findings demonstrated that DS27 is able to modulate cholinergic and purinergic signaling, redox status and pro-inflammatory cytokines in LPS induced astrocyte damage. These glioprotective effects of DS27 compound may be very important to improve neuroinflammation, which is associated with many brain diseases.

**Keywords:** Thiazolidinones, astrocytes, oxidative stress, neuroinflammation, acetylcholinesterase, Ectonucleotidases, interleukin 6.

## Lista de Figuras

### Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Estruturas do núcleo das tiazolidinonas (substituição por cetona em 2, 4 e/ou 5 omitidas) destacando a numeração dos átomos (1), do medicamento pioglitazona (2), e do composto DS27 (3).....17

### Manuscrito

**Figure 1:** Experimental design .....55

**Figure 2:** Effects of DS27 compound (10-100  $\mu$ M) on cellular proliferation of astrocytes treated with lipopolysaccharide (LPS) after for 24 hours and 48 hours. ....56

**Figure 3:** Representative phase-contrast microphotographs of astrocytes exposed to LPS and / or DS27 (10-100 $\mu$ M) treatment after 24 and 48 h. ....57

**Figure 4:** Acetylcholinesterase (AChE) activity in primary astrocytic culture exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours. ....58

**Figure 5:** NTPDase activity using ATP and ADP as substrate and 5'-nucleotidase activity using AMP as substrate in astrocytes exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 compound treatment (10-100  $\mu$ M) after 24 hours and 48 hours. ....59

**Figure 6:** Reactive oxygen species (ROS), nitrite levels, and total thiol content (SH) in compound after treatment for 24 hours and 48 hours. ....60

**Figure 7:** Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) activities in primary astrocyte cultures exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours. ....61

**Figure 8:** Interleukin 6 (IL-6 levels) in primary astrocyte culture exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours. ....62

### **Lista de Abreviaturas e Siglas**

|                              |                                                                 |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| A $\beta$                    | Peptídeo amilóide $\beta$                                       |
| AChE                         | Acetilcolinesterase                                             |
| AMP                          | Adenosina monofosfato                                           |
| ADP                          | Adenosina difosfato                                             |
| AR                           | Receptor de Adenosina                                           |
| ATP                          | Adenosina trifosfato                                            |
| CAT                          | Catalase                                                        |
| CEEA                         | Comitê de Ética em Experimentação Animal                        |
| CONCEA                       | Conselho Nacional de Experimentação Animal                      |
| CTE                          | Cadeia Transportadora de Eletrons                               |
| DA                           | Doença de Alzheimer                                             |
| DCFH-DA                      | Diacetato de 2', 7'-dicloro-dihidrofluoresceína                 |
| DMEM                         | Meio de Eagle Modificado da Dulbecco                            |
| DMSO                         | Dimetilsulfóxido                                                |
| DP                           | Doença de Parkinson                                             |
| DS27                         | 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona |
| DTNB                         | Ácido 6,6'-dinitro-3,3'-ditiobenzoico                           |
| EM                           | Esclerose Múltipla                                              |
| ERO                          | Espécies Reativas de Oxigênio                                   |
| g                            | Gramas                                                          |
| GPx                          | Glutathione Peroxidase                                          |
| h                            | Horas                                                           |
| LOX                          | Lipoxigenase                                                    |
| LPS                          | Lipopolissacarídeo                                              |
| min                          | Minutos                                                         |
| NF- $\kappa$ B               | Fator nuclear $\kappa$ B                                        |
| NO                           | Óxido Nítrico                                                   |
| NOS                          | NO sintases                                                     |
| O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> | Radical ânion superóxido                                        |

|              |                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------|
| PKF-1        | Fosfofrutocinase 1                              |
| PFKFB3       | 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase 3 |
| SOD          | Superóxido Dismutase                            |
| SRB          | Sulforodamina B                                 |
| SNC          | Sistema Nervoso Central                         |
| TLR          | Receptores do tipo Toll                         |
| TNF $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral $\alpha$               |
| $\mu$ M      | micromolar                                      |

## SUMÁRIO

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Introdução</b>                                 | 13 |
| <b>2. Objetivo</b>                                   | 16 |
| 2.1. Objetivo Geral                                  | 16 |
| 2.2. Objetivos Específicos                           | 16 |
| <b>3. Revisão Bibliográfica</b>                      | 17 |
| 3.1. Tiazolidinonas                                  | 17 |
| 3.2. Astrócitos                                      | 19 |
| 3.3. Lipopolissacarídeo                              | 21 |
| 3.4. Estresse Oxidativo                              | 23 |
| 3.4.1. Espécies Reativas de Oxigênio                 | 23 |
| 3.4.2. Nitritos                                      | 25 |
| 3.4.3. Tióis                                         | 26 |
| 3.4.4. Superóxido Dismutase                          | 27 |
| 3.4.5. Catalase                                      | 28 |
| 3.4.6. Glutathione Peroxidase                        | 28 |
| 3.4.7. Glutathione S-transferase                     | 29 |
| 3.5. Acetilcolinesterase                             | 29 |
| 3.6. Enzimas do Sistema Purinérgico                  | 30 |
| 3.6.1. Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases | 32 |
| 3.6.2. Ecto-5'-nucleotidase                          | 32 |
| <b>4. Resultados</b>                                 | 33 |
| 4.1. Manuscrito                                      | 33 |
| <b>5. Discussão</b>                                  | 63 |
| <b>6. Conclusão</b>                                  | 67 |
| <b>7. Referências</b>                                | 68 |
| <b>ANEXOS</b>                                        | 79 |

## 1. Introdução

A neuroinflamação pode ser definida como uma reação imune no sistema nervoso central (SNC), que envolve a reatividade de células gliais, como a microglia e os astrócitos, sendo mediada por fatores pró-inflamatórios como citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; RANSOHOFF, 2016).

Os astrócitos ganham destaque nesse contexto, uma vez que são células gliais com papéis fisiológicos de manutenção da homeostasia do SNC e, para isso, secretam citocinas, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), permitindo o estabelecimento de uma comunicação bidirecional com as demais células residentes do SNC (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Por meio das citocinas, os astrócitos e microglia modulam a resposta inflamatória, sendo que a microglia pode induzir os astrócitos a uma reatividade com perfil neurotóxico (LIDDELOW *et al.*, 2017). Ademais, os oligodendrócitos podem ser induzidos à apoptose ou ter células progenitoras recrutadas por astrócitos, enquanto neurônios são levados à morte por óxido nítrico (NO) produzido em excesso por astrócitos reativos e a migração de células de defesa periféricas são coordenadas por quimiocinas secretadas por astrócitos (LINNERBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020).

A produção de ERO, que possui papel importante na fisiologia celular, havendo depleção das defesas antioxidantes, leva ao estresse oxidativo. No estado de estresse oxidativo, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$ , que podem ativar os astrócitos, promovendo a neuroinflamação. Não obstante, o estresse oxidativo está relacionado à doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP) e esclerose múltipla (EM) e, portanto, o estresse oxidativo é um parâmetro importante em estudos de neuroinflamação (DI MEO *et al.*, 2016).

Nos estudos de neuroinflamação, uma molécula imunogênica presente na parede celular de bactérias gram-positivas, denominado lipopolissacarídeo (LPS), é utilizada como indutor de inflamação e reatividade celular, agindo em receptores específicos nas células, permitindo estudar o comportamento das células do SNC frente a um insulto (BATISTA *et al.*, 2019). As doenças neurodegenerativas, que apresentam essencialmente as características de serem irreversíveis e progressivas,

têm tido a neuroinflamação ligada à danos no trato gastrointestinal, que permitem a introdução de lipopolissacarídeos na corrente sanguínea e à sua consequente presença no tecido do SNC, bem como às ações de astrócitos reativos, que contribuem à neuroinflamação por secreção de  $\text{TNF}\alpha$  e glutamato, intensificando a neuroinflamação e contribuindo na progressão de doenças como a DA, DP e EM (ASADZADEH MANJILI; YOUSEFI-AHMADIPOUR; KAZEMI ARABABADI, 2020; BAIZABAL-CARVALLO; ALONSO-JUAREZ, 2020; ILLES; VERKHRATSKY, 2016; MOMTAZMANESH; PERRY; REZAEI, 2020; QIAN *et al.*, 2021).

Também diretamente envolvido na neuroinflamação, o sistema purinérgico, por meio dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e seus receptores, agem como um meio de comunicação bidirecional entre as células residentes no SNC, coordenando desde o desenvolvimento tecidual à ativação de células importantes na neuroinflamação como os astrócitos (BURNSTOCK *et al.*, 2011; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Além disso, a ativação desses receptores está relacionada com a neuroinflamação por mediar a secreção de citocinas de astrócitos reativos (ILLES; VERKHRATSKY, 2016). Por isso, esse sistema se tornou um alvo farmacológico, requerendo a prospecção de compostos que atuem nesse alvo (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

A acetilcolina (ACh), além de ser um neurotransmissor importante no controle motor, atua como um agente anti-inflamatório, modulando o sistema imune, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o  $\text{TNF}\alpha$  e IL-6 em astrócitos por meio do seu receptor nicotínico  $\alpha 7$ , que se tornou chave na via anti-inflamatória da acetilcolina (LU, J.; WU, 2021; PATEL *et al.*, 2017). Entretanto, devido à ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), expressa por diversas células, a ACh é hidrolisada em milisegundos e tem seu tempo de ação drasticamente reduzido (SILMAN; SUSSMAN, 2005). A fim de aproveitar as ações anti-inflamatórias da ACh, torna-se interessante a prospecção de compostos que inibam a AChE e apresentem ação em diversos alvos, uma vez que esses inibidores têm sido utilizados na clínica na DA, obtendo resultados positivos na cognição, embora ainda muito limitados por outros fatores da doença (HUSNA IBRAHIM *et al.*, 2020).

As tiazolidinonas apresentam um motivo farmacofóro de anel heterocíclico contendo nitrogênio e enxofre, apresentando diversas atividades biológicas de acordo com os substituintes e já estando presente em medicamentos (KAUR MANJAL *et al.*,

2017; NIRWAN; CHAHAL; KAKKAR, 2019), e recentemente, alguns compostos sintetizados apresentaram atividade como inibidores de AChE e protegendo contra o estresse oxidativo, em modelos *in vitro* e *in vivo*, revelando um potencial como compostos com potencial multi-alvo (DA SILVA *et al.*, 2020, 2021), e tornando-se promissores candidatos a fármacos do SNC.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da tiazolidin-4-ona, 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) sobre parâmetros de proliferação e morfologia celular, status redox, níveis de IL-6 e na atividade da AChE e nas enzimas do sistema purinérgico, em cultivo primário de astrócitos de ratos submetidos a um modelo *in vitro* de neuroinflamação induzido por LPS.



## **2. Objetivo**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Investigar o potencial glioprotetor da DS27 em cultura primária de astrócitos de ratos submetidos a um modelo *in vitro* de neuroinflamação induzido por LPS.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da DS27 sobre a proliferação astrocitária e sobre alterações morfológicas induzidas pela exposição ao LPS;

- Analisar o potencial protetor da DS27 sobre as alterações na hidrólise de ATP, ADP e AMP em astrócitos expostos ao LPS;

- Investigar a ação antiacetilcolinesterásica da DS27 em astrócitos após exposição ao LPS.

- Avaliar o efeito da DS27 sobre os marcadores de danos oxidativo, bem como sobre a atividade de enzimas antioxidantes em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS.

- Analisar os efeitos da DS27 nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Tiazolidinonas

As tiazolidinonas são compostos químicos cujo motivo principal é um anel heterocíclico contendo um átomo de enxofre, na posição 1, um átomo de nitrogênio, na posição 3, e um grupo carbonila em qualquer uma das demais posições (**FIGURA 1**). As propriedades físicas destes compostos variam de sólido a líquido, de solúveis a insolúveis em água, de acordo com os substituintes presentes (NIRWAN; CHAHAL; KAKKAR, 2019). Devido a possibilidade de substituição nas posições 2, 3 e 5, diversas atividades biológicas são obtidas e, incluso, o anel tiazolidínico está presente em medicamentos como a pioglitazona, um agente hipoglicemiante (**FIGURA 1**) (KAUR MANJAL *et al.*, 2017).

Esse anel tiazolidínico, motivo farmacofóro, é de grande potencial ao desenvolvimento de compostos para tratamento de diversas doenças – sejam crônicas ou infecciosas. Diversos derivados de tiazolidin-4-onas, principalmente híbridos de tiazolidin-4-ona com cumarina, são estudados objetivando uma atividade antibacteriana contra o bacilo causador da tuberculose – doença com incidência de milhões de pessoas ao ano – apresentando resultados promissores (TROTSKO, 2021). Na ação antiparasitária, outro estudo avaliou derivados de tiazolidin-4-onas diclorinadas contra o causador da doença de chagas, *Trypanosoma cruzi*, relatando alguns compostos com ação antiparasitária superior ao benznidazol, medicamento utilizado no tratamento da doença (BEZERRA DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

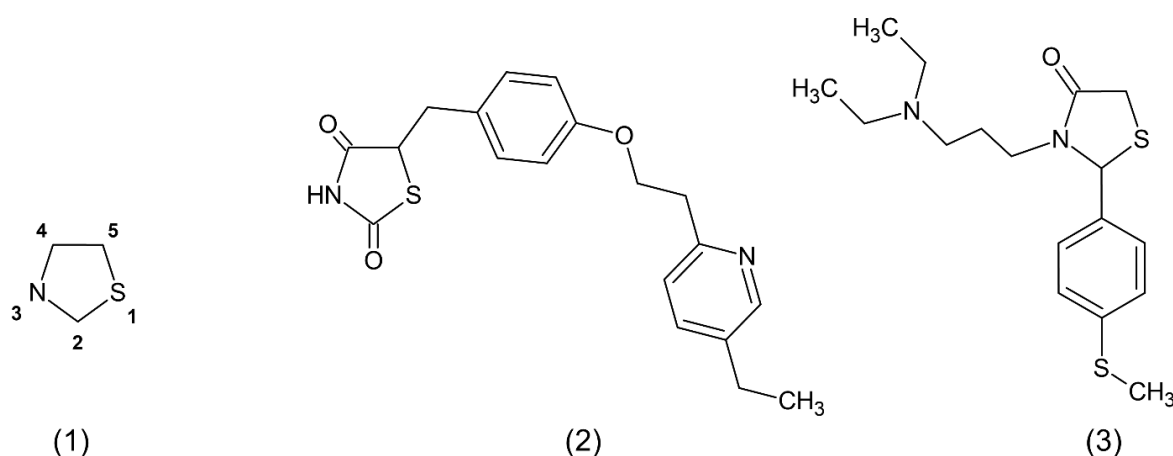
Para prospectar novo composto para o tratamento de diabetes (PIRES MENDES *et al.*, 2021), realizaram a hibridização molecular de glibenclamida com pioglitazona, relatando, por um dos híbridos produzidos, ações positivas na homeostasia glicolítica, aumentando a sensibilidade à insulina em animais. Em outro estudo, com fibroblastos de camundongos, derivados tiazolidínicos foram comparados à pioglitazona e rosiglitazona, onde um dos derivados apresentou resultado promissor (SZYCHOWSKI *et al.*, 2021).

Nos papeis anticâncer, (AFIFI *et al.*, 2019) hibridizaram derivados de compostos purínicos com o motivo tiazolidinona visando obter potenciais inibidores da isoforma 15 da enzima lipoxigenase (LOX-15), cujos metabólitos estão associados a algumas linhagens de câncer, relatando alguns com boa inibição de LOX *in vitro*. Em

outro estudo, a hibridização dos motivos tiazolidin-4-ona com indol produziu um derivado que afetou negativamente a polimerização de tubulina e apresentou atividade anti-proliferativa *in vitro* em linhagens de câncer de cólon, pulmonar e de mama (SIGALAPALLI *et al.*, 2019).

O grande potencial do grupo farmacofóro das tiazolidin-4-onas também despertou a atenção do nosso grupo de pesquisa. O potencial antiglioma de derivados piperidínicos de tiazolidin-4-onas foram avaliados em modelo *in vitro* e *in vivo* de glioblastoma multiforme, revelando um composto promissor (DA SILVEIRA *et al.*, 2017). A seguir, o uso de nanoencapsulação de um derivado piperidínico de tiazolidin-4-ona em modelos *in vitro* de glioblastoma e toxicidade *in vivo* demonstrando não causar toxicidade e ser efetivo contra células tumorais (DA SILVEIRA *et al.*, 2019).

Outras tiazolidin-4-onas foram sintetizadas, apresentando baixa toxicidade em astrócitos *in vitro* (DA SILVA *et al.*, 2016). Desses compostos, um derivado piperidínico apresentou efeitos antioxidante, anti-inflamatório e de inibição da acetilcolinesterase (AChE) (DA SILVA *et al.*, 2021). Em particular, dois derivados piperidínicos e um derivado dietilamino destacaram-se na inibição da AChE em ratos e estudo de *docking* revelou similaridades com o medicamento donapezila (DA SILVA *et al.*, 2020). O derivado dietilamino avaliado era o 3-(3-(dietilamino)propil)-2-(4-(metiltio)fenil)tiazolidin-4-ona (DS27) o qual foi avaliado no presente estudo.



**Figura 1** – Estruturas do núcleo das tiazolidinonas (substituição por cetona em 2, 4 e/ou 5 omitidas) destacando a numeração dos átomos (1), do medicamento pioglitazona (2), e do composto DS27 (3).

### 3.2. Astrócitos

Inicialmente descrita apenas como uma *massa* ou *cola* para os neurônios – o termo *glia*, do grego, refere-se a massa ou goma – essas células vieram ganhando importância no contexto fisiológico do sistema nervoso central (SNC). Astrócitos são células neurogliais residentes no SNC, originados a partir da glia radial, de células NG2 e de astrócitos diferenciados durante a embriogênese, embora o período pós-natal seja no qual a maioria da população astrocitária de todo o SNC se desenvolva (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

Em adultos, os astrócitos estão presentes tanto na massa branca quanto na massa cinzenta, incluso ao longo das camadas do córtex cerebral. Apesar de apresentarem, em humanos, diversas formas, cada astrócito emite inúmeras projeções cujas terminações compõem estruturas deveras importantes da anatomia do SNC como (1) a barreira cérebro-sangue, onde vasos sanguíneos são recobertos por pés-terminais astrocitários; (2) a unidade neurovascular, onde o astrócito porta-se como mediador entre a circulação sanguínea e a atividade neuronal; e (3) a sinapse tripartite, formada entre neurônio pré- e pós-sináptico, onde a fenda sináptica é recoberta pelas projeções astrocíticas e estima-se que cada astrócito, em humanos, possa recobrir até dois milhões de sinapses (OBERHEIM *et al.*, 2009; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

Embora a própria presença dos astrócitos na anatomia do encéfalo evidentemente reflita um papel importante dessa célula glial na fisiologia do tecido, as características celulares dos astrócitos e sua inter-relação com neurônios, assim como as demais células, é que expõe a sua centralidade na manutenção da homeostasia e desenvolvimento do SNC (ABBINK *et al.*, 2019).

O consumo de energia produzida via metabolismo corporal pelo SNC é enorme: cerca de 25% da glicose consumida diariamente, assim como 20% do oxigênio, é utilizada pelo SNC, o que, para um cérebro de 1,4 Kg equivale a aproximadamente 91 g de glicose e 75 litros de oxigênio (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; DIENEL, 2019). Isso é necessário em vista de que a própria manutenção de um neurônio em repouso é custosa, cerca de  $342 \cdot 10^6$  ATP·s<sup>-1</sup>/célula, *versus*  $102 \cdot 10^6$  ATP·s<sup>-1</sup>/célula consumidos por um astrócito também em repouso (ATTWELL; LAUGHLIN, 2001).

Esse alto consumo de energia se traduziria em metabolismo glicolítico e do ciclo de Krebs intenso em ambas as células, o que não foi corroborado em razão de certas peculiaridades bioquímicas tanto de astrócitos quanto de neurônios. Por exemplo, devido à estabilização da enzima 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase 3 (PFKFB3, do inglês 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3), que regula positivamente a glicólise por ativação da 6-fosfofrutocinase-1 (PKF1, do inglês 6-phosphofructokinase) os astrócitos são produtores notáveis de lactato, que é liberado ao meio extracelular e ficam à disposição de neurônios (BARROS *et al.*, 2021).

Em neurônios, a enzima PFKFB3 é degradada, causando a regulação negativa da via glicolítica e permite que neurônios protejam-se de danos oxidativos por indução da via das pentoses fosfato – via responsável pela produção de NADPH, nucleotídeo utilizado na regeneração das defesas antioxidantes não enzimáticas – utilizando-se do lactato secretado por astrócitos (HERRERO-MENDEZ *et al.*, 2009). Outro fator é que o metabolismo glicolítico intenso leva à formação de metilglioxal, um composto que leva à modificação de proteínas, RNA e DNA por glicação, que é detoxificado por meio de glioxalases e com consumo de glutatona, sendo altamente expressas em astrócitos e pouco em neurônios (COBLEY; FIORELLO; BAILEY, 2018; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2015). Portanto, a inter-relação do metabolismo da glicose entre astrócito-neurônio apresenta-se como um dos contribuintes do papel neuroprotetor dos astrócitos – onde o neurônio permite-se poupar da face tóxica de uma glicólise acentuada compensando com o lactato astrocitário.

A reatividade astrocitária modifica profundamente a morfologia e a fisiologia celular e esse evento tem como chave o fator nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), ativado por diversos fatores como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), espécies reativas de oxigênio (ERO) e receptores do tipo toll (TLR). Esse processo desencadeia liberação de citocinas que servem de comunicação entre astrócitos e micróglia, potencializando a reatividade dessas células. Neurônios também são afetados pela reatividade astrocitária por meio da alteração da recaptação astrocitária e neuronal de neurotransmissores, bem como da liberação de óxido nítrico (NO) que, em excesso, é neurotóxico (LINNERBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020).

### 3.3. Lipopolissacarídeo

Os lipopolissacarídeos (LPS) são uma classe de glicolipídeos de membrana que recobrem a maioria da superfície de bactérias gram-negativas. Esses glicolipídeos constituem-se de uma porção lipídica, denominado lipídeo A, que é glicosilada por uma sequência curta de oligossacarídeos nomeados de núcleo OS. Ainda, o núcleo OS é glicosilado por uma cadeia longa polissacarídica de resíduos repetidos, denominado antígeno O, que apresenta uma variabilidade nas suas características, que levam à formação de inúmeros sorogrupos de antígeno O, que caracterizam cepas bacterianas (WHITFIELD; WILLIAMS; KELLY, 2020). Assim como são variados os LPS, mais em função do antígeno O do que pelo mais conservado lipídeo A, os seus efeitos biológicos variam, onde o LPS de uma cepa ou espécie bacteriana pode apresentar variações na capacidade adjuvante, na pirogenia, na toxicidade, na interação com receptores e proteínas do hospedeiro e na indução de citocinas, dependendo tanto do lipídeo A quanto do antígeno O. Não obstante, na pesquisa empregam-se comumente LPS de enterobactérias como a *Escherichia coli* devido serem as primeira estudadas e ter a estrutura conhecida (CAROFF *et al.*, 2002; NETEA *et al.*, 2002; SAMPATH, 2018).

O organismo hospedeiro reconhece o LPS, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês *pattern recognition receptor*), que fazem parte do sistema imune inato, denominados receptores do tipo toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e divididos de TLR1 a 10. Entretanto, os TLR3,7,8,9 são intracelulares, expressos em membranas endossomais, e reconhecem ácidos nucleicos; o TLR2, presente na membrana plasmática celular, forma dímeros com TLR1,6,10 e reconhecem padrões moleculares de bactérias gram-positivas e fungos; TLR5, expresso na membrana plasmática, é utilizado para reconhecer padrões moleculares do flagelo de bactérias; e o TLR4, expresso na membrana plasmática, é o receptor que reconhece o LPS (PAUL-CLARK *et al.*, 2012).

Após o TLR4 reconhecer o LPS, ele se oligomeriza e recruta cinco proteínas: (1) a proteína gene 88 de resposta primária de diferenciação mieloide (MyD88, do inglês *myeloid differentiation primary response*); (2) proteína adaptadora contida no receptor toll-interleucina-1 (TIRAP, do inglês *Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*); (3) o adaptador indutor de IFN- $\beta$  contido no receptor toll-interleucina-1 (TRIF, do inglês *Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor*

*inducing IFN- $\beta$* ); (4) molécula adaptadora TRIF-relacionada (TRAM, do inglês *TRIF-related adaptor molecule*); e (5) proteína contendo motivos estéril- $\alpha$  e HEAT-Armadillo (SARM, do inglês *sterile  $\alpha$  and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*) (O'NEILL; BOWIE, 2007). A transdução de sinal pelo receptor foi dividida em duas vias, uma dependente de MyD88, ativando uma cascata que leva à translocação de fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor- $\kappa$ B*) e à produção de citocinas, e outra via independente de MyD88, que desencadeia a produção de interferons (LU, Y. C.; YEH; OHASHI, 2008).

O NF- $\kappa$ B é uma família que compreende cinco proteínas que apresentam um domínio que permite a dimerização entre as proteínas, a ligação ao DNA e ligação a proteínas inibidoras de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Após um estímulo, como o do LPS ao TLR4, a ativação de cinases que fosforilam as I $\kappa$ B resultam na liberação de proteínas da NF- $\kappa$ B, que se dimerizam e, ao translocar-se para o núcleo celular, ligam ao DNA promovendo a expressão de inúmeros genes envolvidos com a imunidade, inflamação e proliferação celular. A dimerização mais frequente e descrita é a da proteína RelA (p65) com a proteína NF- $\kappa$ B1 (p50) – dimerização chamada de NF- $\kappa$ B (CARLSEN *et al.*, 2004). O NF- $\kappa$ B também tem um papel metabólico. Em astrócitos, o NF- $\kappa$ B aumenta o metabolismo glicolítico, glicogênolítico e mitocondrial, além de diminuir a expressão do transportador de glicose 1 (GLUT1, do inglês *Glucose transporter 1*) após exposição ao LPS – possivelmente visando a diminuição da resposta inflamatória (ROBB *et al.*, 2020).

A relação entre LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B também é estudada no contexto da neuroinflamação e doenças neurodegenerativas, pois a resposta celular de produção de citocinas ocorre tanto a nível periférico quanto central. Ainda, a presença de fragmentos microbianos, como o LPS, de diversas espécies no tecido cerebral de pacientes com DA, indicam uma ligação entre a microbiota intestinal, o sistema vascular periférico, o sistema nervoso periférico e o SNC (QIAN *et al.*, 2021). Para a DP, a mesma relação, envolvendo a alteração da microbiota intestinal com indução de inflamação no SNC, incluso de indução da proteína  $\alpha$ -sinucleína, característica na DP, foi revisado recentemente (BAIZABAL-CARVALLO; ALONSO-JUAREZ, 2020).

Em cultivo celular de astrócitos, o LPS induziu um aumento de expressão de TNF $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) de modo dependente de concentração e tempo de exposição ao LPS, com um pico em 4h para o TNF $\alpha$  e 6h

para IL-6 e IL-1 $\beta$  (RODGERS *et al.*, 2020). Após 24h de exposição ao LPS, foi relatado um aumento nos níveis de TNF $\alpha$  e IL-6, mitigados pela supressão da via do NF- $\kappa$ B (ROBB *et al.*, 2020). A exposição a períodos maiores que 24h levaram a aumentos de nitritos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e glutamato no meio extracelular, sem, no entanto, alterações no funcionamento do complexo I da cadeia respiratória ou nos níveis de glutathione (MCNAUGHT; JENNER, 2000). Em outros estudos, exposição a 24h de LPS aumentaram a taxa de hidrólise de ATP, sem afetar a taxa de hidrólise de ADP ou AMP, embora a exposição a TNF $\alpha$  tenha provocado aumentos na taxa de hidrólise dos três nucleotídeos (BRISEVAC *et al.*, 2012, 2013).

Por isso, o LPS é um bom modelo de neuroinflamação que permite avaliar as respostas desencadeadas por células reativas nas doenças neurodegenerativas, mesmo via modelos *in vitro*, uma vez que astrócitos de roedores e de humanos expressam o gene TLR4 - que reconhece o LPS e desencadeia respostas imunes, e, dessa forma, pode-se estudar as alterações das células do SNC individualmente (BATISTA *et al.*, 2019; BOWMAN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2016).

### **3.4. Estresse Oxidativo**

#### **3.4.1. Espécies Reativas de Oxigênio**

Radicais livres são espécies químicas capazes de existirem independentemente e que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados no(s) orbital(ais). Ao coletivo de radicais livres deu-se o nome de espécies reativas de oxigênio (ERO) – que inclui também diversas espécies não-radicalares, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>) e peróxidos orgânicos (ROOH) (HALLIWELL, 2006).

Uma das principais fontes de ERO na célula é a mitocôndria, especificadamente através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), onde a redução de O<sub>2</sub> por um elétron forma o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), que apresenta um elétron desemparelhado. Apesar dessa espécie não ser tão reativa quanto O<sub>2</sub> ou quanto a altamente reativa hidroxila (OH<sup>•</sup>) e de ser convertida por enzimas da mitocôndria a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a sua reação com outras espécies – como o óxido nítrico (NO) – leva à formação de outros ERO mais reativos (HALLIWELL, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Embora didaticamente trate-se as mitocôndrias nas diversas células



como sendo iguais, (LOPEZ-FABUEL *et al.*, 2016) relataram que o complexo I da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias astrocitárias tentem a não formarem supercomplexos com o complexo III e que apresentam subunidades proteicas no complexo I que facilitam o escape de elétrons para  $O_2$ , enquanto que o contrário é visto em neurônios. Portanto, apesar de a formação de ERO ocorrer à concentração de oxigênio normal a qual a célula está exposta (STEPANOVA *et al.*, 2019), diferenças estruturais na cadeia transportadora de elétrons ditam características que fazem dos astrócitos maiores produtores de ERO de que neurônios.

A produção de ERO tem diversos papéis biológicos importantes. Por exemplo, em condições de hipóxia ocorre diminuição dos complexos I e III, acarretando em aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  e, consequentemente,  $H_2O_2$  que ativam o fator 1-alfa induzido por hipóxia (HIF1- $\alpha$ ) e este mesmo fator induz a transcrição de subunidade do complexo I alternativa, resolvendo o estado de hipóxia (COBLEY; FIORELLO; BAILEY, 2018). Além disso, em astrócitos, níveis normais de ERO mitocondrial promove a atividade do fator nuclear relacionado ao eritróide-2 fator 2 (NRF2, do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), que possui como alvo o gene da glutamato-cisteína ligase (GCL), enzima-chave na síntese de glutatona (GSH); ainda, níveis normais de ERO em astrócitos reprime a expressão de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), enzima-chave da via das pentoses fosfato, desviando o metabolismo astrocitário para a glicólise (VICENTE-GUTIERREZ *et al.*, 2019).

Embora as ERO tenha um papel biológico, o seu excesso, somado à depleção dos mecanismos antioxidantes como a glutatona, causam estresse oxidativo, fator que tem sido estudado por sua presença em doenças neurodegenerativas e na neuroinflamação. Na DA, caracterizada por agregados de peptídeo amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) e de fibrilas de proteína tau, neurônios dos pacientes apresentam mitocôndrias danificas e tanto a  $A\beta$  quanto a proteína tau interferem na cadeia transportadora de elétrons bem como induzem micróglia e astrócitos à reatividade e, uma vez ativados, ambas células aumentam a produção de ERO, ampliando os danos. Marcadamente, astrócitos na DA encontram-se próximos a áreas ricas em  $A\beta$  e fibrilas de proteína tau e apresentam aumento de ERO com diminuição de GSH intracelular e diminuição da atividade de superóxido dismutase (SOD) (CARTER *et al.*, 2019; FISCHER; MAIER, 2015; KIM, E. *et al.*, 2020).

Na DP, caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra, a proteína  $\alpha$ -sinucleína, componente dos corpos de Lewis, age inibindo o complexo I da CTE. Da mesma forma, o composto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), usado em modelos para a doença, age inibindo o complexo I da CTE – o que leva ao aumento da produção de ERO mitocondrial – e promove diminuição de SOD. Todavia, a regulação positiva do NF- $\kappa$ B na neuroinflamação leva à um ciclo de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF $\alpha$  e IL-6 e aumento de ERO. Enquanto que o envelhecimento é outro fator importante, uma vez que pacientes com DP e idosos ambos apresentam mutações no DNA mitocondrial, a própria dopamina sofre autooxidação, produzindo ERO (FISCHER; MAIER, 2015; KUMAR *et al.*, 2012; RIZOR *et al.*, 2019).

Na EM, doença autoimune do SNC mais comum, resultante da desmielinização de neurônios do encéfalo, faz com que o requisito energético de ATP para a manutenção neuronal aumenta, refletindo no achado de maior conteúdo mitocondrial nas células neuronais, bem como a presença de CTE disfuncional – levando a aumento de ERO, como  $O_2^{\bullet-}$  e NO - provocando danos oxidativos que levam à apoptose celular (ELLWARDT; ZIPP, 2014; ISLAM, 2017).

### 3.4.2. Nitritos

Oxido nítrico (NO) é uma espécie radicalar, possuindo um elétron desemparelhado, sintetizada por enzimas da família das NO sintases (NOS) a partir da oxidação da L-arginina, que se difunde facilmente por entre membranas celulares e, embora pouco reativo, é capaz de autooxidar a nitrito ( $NO_2$ ) ou reagir com grupo tiol, nitrosilando-o (HEINRICH *et al.*, 2013; PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019). No encéfalo, NO possui diversas atividades fisiológicas como vasodilatador, regulador da liberação de citocinas durante a neuroinflamação e também age como neurotransmissor em neurônios glutamatérgicos (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019).

A medição dessa molécula *in vivo* é dificultada pela sua curta meia-vida, por isso desenvolveram-se técnicas que medem espécies derivadas dele, como, por exemplo,  $NO_2$  que pode ser produzido por autooxidação ou por enzimas. Uma forma de medir nitritos é por método de griess que baseia-se na oxidação de sulfonilamida

por NO<sub>2</sub> em meio ácido e subsequente reação com N-(1-naftil)etilenodiamina formando um produto colorido (MÖLLER *et al.*, 2019). Entretanto, o intermediário formado na reação pode reagir com outras espécies de nitrogênio, como o nitrosônio, e inclusive grupo tiol. Portanto, a interpretação pode ser prejudicada em amostras com alto conteúdo tiólico e ela não permite considerar outras espécies derivadas do NO (HOGG; ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2017).

### 3.4.3. Tióis

O grupo lateral tiol (-SH), presente nos resíduos de cisteína, aminoácido cujo conteúdo aumenta de acordo com uma maior complexidade do organismo, é um reservatório de poder redutor na célula, podendo sofrer oxidação por um ou dois elétrons, comumente provenientes de ERO, levando à formação de espécies S-nitrosotiol e ácido cisteína-sulfênico, respectivamente (ULRICH; JAKOB, 2019). Ambas espécies podem reagir com outros resíduos de cisteína e as ligações dissulfídicas formadas a partir dessa reação podem levar à modificações que alteram o funcionamento adequado de proteínas – e que pode ser revertido por meio das defesas antioxidantes enzimáticas da célula – ou até mesmo à destruição de proteínas (FERNANDO *et al.*, 2019; SHEEHAN; MCDONAGH, 2020).

A própria cisteína livre é um agente redutor, mas devido a sua rápida autooxidação e baixa solubilidade, o organismo vale-se de seu poder redutor via o tripeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteinil glicina – a glutathiona (GSH), presente nas células em concentração de 10 mM, sendo produzida no citosol e importada para a mitocôndria e retículo endoplasmático (ULRICH; JAKOB, 2019). Não obstante, todos esses tióis, em resíduos de cisteína, não são apenas alvos de oxidação por ERO produzido pelo metabolismo celular, mas são utilizados pelo maquinário celular, via modificações pós-traducionais no tiol, em diversas funções fisiológicas como a degradação de proteína, correção de dobras e secreção de proteínas, por exemplo (RADZINSKI *et al.*, 2021).

Nas doenças neurodegenerativas encontram-se presentes modificações que alteram o funcionamento celular, como a proteína 1 relacionada à dinamina (Drp1) que induz fissão mitocondrial ao ser S-nitrosilada e essa modificação de grupo tiol é encontrada na DA, assim como a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que age no dobramento correto de proteína no retículo endoplasmático, ao ter grupos tiólicos

oxidados, pode perder suas funções ou até mesmo ser deslocada ao citoplasma, interferindo no funcionamento de enzimas próximas (FINELLI, 2020).

#### **3.4.4. Superóxido Dismutase**

A superóxido dismutase (SOD) é uma das enzimas que constitui a defesa antioxidante celular, sendo a responsável na remoção de ERO, precisamente  $O_2^{\cdot-}$ , reduzindo-o a  $H_2O_2$ . Para isso, ambas isoformas apresentam metais como cofatores, os quais doam os elétrons para a redução de  $O_2^{\cdot-}$ , um homotetrâmero ligado a manganês (Mn-SOD) e um homodímero ligado a cobre e zinco (Cu/Zn-SOD). Ambas estão presentes em todas as células do corpo e enquanto Mn-SOD é detectada na matriz mitocondrial, Cu/Zn-SOD é presente em outras partes celulares como citoplasma, núcleo e espaço intermembranas mitocondrial de diversas células, incluso do SNC (LINDENAU *et al.*, 2000; STEPHENIE *et al.*, 2020).

No cérebro de ratos, tanto a Cu/Zn-SOD como Mn-SOD tem uma distribuição uniforme, com poucas variações de expressão entre estruturas, diferindo apenas na ponte, onde há maior expressão (CAMPESE *et al.*, 2007). Por dismutar o  $O_2^{\cdot-}$ , a SOD é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e permite a manutenção da homeostasia redox da célula (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Isso é aferido onde a supressão da expressão dessa enzima, em diversos modelos, está associado a um aumento de ERO e à consequente morte celular por apoptose, resultante da ativação de caspases, com aumento de produção e acúmulo de ERO (BRETNALL *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-RUIZ *et al.*, 2021; LEITCH *et al.*, 2012).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNIP) nos genes que codificam as isoformas das enzimas estão associados com diversas doenças, como câncer de mama, e indivíduos que sofreram derrame e portavam SNIP no gene da Mn-SOD apresentaram menores níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator importante na regeneração cerebral após um episódio de derrame (CRAWFORD *et al.*, 2012; PASCOTINI *et al.*, 2018). Em camundongos, no modelo de DP por injeção intraestriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um análogo neurotóxico de dopamina, indivíduos transgênicos para superexpressão de Mn-SOD apresentaram menores danos neuronais na substância nigra (CALLIO; OURY; CHU, 2005).

### 3.4.5. Catalase

A enzima tetramérica catalase (CAT) possui um cofator metálico, ferro ou manganês, e catalisa a redução de  $H_2O_2$  a água no citoplasma e em peroxissomas, de modo coordenado com a SOD, a maior fonte de  $H_2O_2$  celular, e faz parte da linha de frente das defesas antioxidantes enzimáticas (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Além de agir principalmente na remoção de altas concentrações de  $H_2O_2$ , a CAT também age em peroxinitritos – formados por reações do metabolismo do NO – e tem sua expressão alterada em diversos tipos de cânceres (GALASSO *et al.*, 2021; GEBICKA; DIDIK, 2009).

Em cultivo primário de astrócitos de ratos, a CAT está presente homogeneamente por toda a célula e tem sua atividade dependente da atividade da glutathiona peroxidase (GPx), e também ao conteúdo de GSH, uma vez que, em ambiente depletado de GSH ou no qual a GPx esteja inativada, a CAT auto inativa-se (SOKOLOVA *et al.*, 2001). Ainda em relação à sua atividade, foi relatado que o medicamento pioglitazona (**FIGURA 1**), que apresenta um núcleo farmacofóro de tiazolidin-2,4-ona, é capaz de aumentar a sua atividade específica (GRAY *et al.*, 2012). Em outro estudo, o medicamento galantamina, um anticolinesterásico, foi associado a um aumento de atividade da CAT, em ratos modelo para hipóxia-isquemia neonatal (ODORCYK *et al.*, 2017). Em pacientes de EM foi relatado o aumento da atividade da CAT na massa cinza, possivelmente um mecanismo de redução de danos decorrentes do excesso de produção de ERO nessa doença (GRAY *et al.*, 2014).

### 3.4.6. Glutathiona Peroxidase

A glutathiona peroxidase (GPx), assim como a CAT, é uma enzima que catalisa a redução de  $H_2O_2$  a água utilizando GSH como o doador de elétrons. São conhecidas oito isoformas da enzima em vertebrados, sendo a isoforma GPx1 mais expressa em astrócitos cultivados. (DRINGEN; BRANDMANN, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Essa isoforma pode reagir também com hidroperóxidos de baixo peso molecular, e está associada a efeito anti-inflamatório – devido ação antioxidantes, mas também sua superexpressão está associada com o diabetes, por provocar hiperinsulinemia, e expressão de citocinas pró-inflamatórias (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Em doenças neurodegenerativas, diversas observações apontam para uma regulação negativa da GPx1 como baixos níveis de selênio, um cofator importante da

enzima, em pacientes de DA e DP e, também, redução da atividade da enzima em soro de paciente da DP e atividade reduzida da enzima na DA associado à ação do peptídeo A $\beta$  no cérebro de ratos (SHARMA *et al.*, 2021). Outro fator que contribui para a neurodegeneração é o envelhecimento. Em ratos, foi observado diminuição do conteúdo de GSH, com diminuição da enzima chave na síntese *de novo* de GSH –  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, aumento da glutathione redutase (GR) – que recicla GSH a partir da glutathione dissulfeto - e aumento da atividade da GPx, revelando uma descompensação no ciclo da glutathione com o envelhecimento (ZHU; CARVEY; LING, 2006).

#### 3.4.7. Glutathione S-transferase

A glutathione-S-transferase (GST) representa uma família de enzimas que agem no metabolismo de xenobióticos, e outros compostos como nitratos orgânicos, através da conjugação desses compostos à GSH, e estão presentes em diversos sub-compartimentos celulares, como o citosol, mitocôndria e retículo endoplasmático (BJØRKLUND *et al.*, 2021; BURATTI *et al.*, 2021; TSIKAS; SURDACKI, 2020).

Polimorfismos e deleções nos genes das classes de GST estão relacionados à perfil neuroprotetores ou a maior risco de desenvolver a DA, à maior susceptibilidade à neurotoxicidade na DP e ao desenvolvimento da EM (DASARI *et al.*, 2018; ŽIVKOVIĆ *et al.*, 2013). Além das ações antioxidantes dessas enzimas, a deleção de GST em neurônio de *D. melanogaster* promove a fusão mitocondrial em axônios nas condições de níveis aumentados de GSSG e baixos de GSH, entretanto sem aumento de ERO (SMITH *et al.*, 2019). Portanto, alterações na atividade dessa enzima podem modificar eventos mitocondriais importantes e acarretar em danos celulares aumentados em doenças neurodegenerativas.

#### 3.5. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima que catalisa a hidrólise da acetilcolina a colina e acetato, expressa em todos os tecidos, e é a principal colinesterase no tecido nervoso - seu homólogo butirilcolinesterase (BuChE), é a principal na circulação - sendo a responsável pelo controle do tônus colinérgico (VAKNINE; SOREQ, 2020). A acetilcolina, afora seu papel no controle motor, ao ligar nos seus receptores nicotínicos, apresenta um importante papel anti-inflamatório, tanto periférico quanto central, através da supressão da cascata da NF- $\kappa$ B, portanto,

inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e IL-6 (LU, J.; WU, 2021; PATEL *et al.*, 2017).

Em astrócitos, esse mecanismo anti-inflamatório da acetilcolina pelos seus receptores nicotínicos levando à supressão da cascata da NF- $\kappa$ B, envolvendo também a ativação de Nrf2, foi capaz de evitar morte neuronal por apoptose (PATEL *et al.*, 2017). Na DA, a presença de placas extracelulares de proteína A $\beta$  e emaranhados intracelulares neurofibrilares promovem neuroinflamação por ativação da NF- $\kappa$ B, levando à secreção de citocinas pró-inflamatórias, por astrócitos e microgila reativos, que suprimem a capacidade fagocítica (HUSNA IBRAHIM *et al.*, 2020).

Os inibidores da AChE ainda são importantes fármacos empregados no tratamento da DA por apresentarem melhora cognitiva. Desses, a donepezila destaca-se por, além de inibir a AChE, apresentar neuroproteção por outros mecanismos, como interação com receptores e modulação de estresse oxidativo (MARUCCI *et al.*, 2021). Logo, são necessários fármacos multi-alvos, que possam agir no contexto heterogêneo das patologias (HUSNA IBRAHIM *et al.*, 2020). As tiazolidinonas tem um grande potencial nesse contexto, em especial as estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, por agirem como inibidores da AChE, de modo similar ao da donepezila, e também por agirem em outros alvos potenciais na neuroinflamação como o estresse oxidativo (DA SILVA *et al.*, 2021).

### **3.6. Enzimas do Sistema Purinérgico**

O sistema purinérgico é um sistema evolutivamente conservado, no qual nucleotídeos, essencialmente os de adenosina, liberados ao meio extracelular, por exocitose ou por canais de membrana, durante neurotransmissão ou após dano celular, podem ativar receptores específicos e terem seus grupos fosfatos hidrolisados até adenosina por enzimas presentes na membrana celular (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; PUCHALOWICZ *et al.*, 2015).

Essa sinalização desenvolveu-se de modo a integrar as atividades das células que compõe o SNC e está envolvida em diversas funções importantes, como na formação da memória e aprendizado, ciclo do sono, atividades locomotoras, fome, humor e tomada de decisão, entretanto exercendo respostas diversas dependente do receptor, ligante e região do encéfalo envolvidos (BURNSTOCK *et al.*, 2011).

Os receptores purinérgicos são classificados em receptores de Adenosina (AR, com quatro subtipos), em receptores P1, ativados por adenosina e ligados à proteína G, e receptores P2, compreendendo receptores ionotrópicos (P2X, com sete subtipos) e metabotrópicos (P2Y, com oito subtipos), ambos ativados por nucleotídeos (OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016; ZARRINMAYEH; TERRITO, 2020).

A adenosina tem um papel fisiológico importante no SNC, pois modula a neurotransmissão alterando a excitabilidade do neurônio pós-sináptico e a liberação de neurotransmissor pelo neurônio pré sináptico, e também sendo associada à indução do sono e pelo papel de neuroproteção (BURNSTOCK *et al.*, 2011; ZARRINMAYEH; TERRITO, 2020). Em astrócitos, a adenosina participa da modulação de secreção de citocinas, liberação de glutamato e do fator de crescimento neuronal (CUNHA, 2005; TOZAKI-SAITOH; TSUDA; INOUE, 2011). Em doenças neurodegenerativas como a DA, DP e a EM, receptores de adenosina presentes em astrócitos foi relacionado com a neuroinflamação presente nessas doenças – por liberação de citocinas mediante ativação desses receptores (ILLES; VERKHRATSKY, 2016).

No desenvolvimento do SNC, o ATP, através dos receptores P2, atua na proliferação e no trofismo de células tronco neurais, determinando a migração, a diferenciação e a proliferação tanto *in vivo* quanto *in vitro*, assim como participa da regulação da fome e do consumo de alimento pelo organismo adulto (BURNSTOCK *et al.*, 2011; OLIVEIRA; ILLES; ULRICH, 2016). Além de astrócitos serem secretadores de ATP – que funciona como um gliotransmissor – esse nucleotídeo, por meio de receptores P2, induz o estado de astrogliose, característico na neuroinflamação (PUCHALOWICZ *et al.*, 2015; TOZAKI-SAITOH; TSUDA; INOUE, 2011).

Embora os nucleotídeos apresentem papéis tão proeminentes na fisiologia do organismo por meio dos receptores presentes nas membranas celulares, seus níveis extracelulares são mantidos bastante baixos por meio de várias enzimas conhecidas como ectonucleotidases – o ponto inicial de uma cascata de hidrólise de grupos fosfato, capaz de converter o ATP até adenosina (ZIMMERMANN, 2020). Em vista desse papel no sistema purinérgico, a alteração da atividade e expressão de ectonucleotidases tornou-se um alvo farmacológico em potencial pela possibilidade de modular as interações entre neurônios e glia, bem como as ações dessas células



na neuroinflamação ao alterar as concentrações de nucleotídeos e de adenosina extracelulares (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

### **3.6.1. Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases**

As ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase) são uma família de enzimas que catalizam a hidrólise de di- e tri- nucleotídeos e nucleosídeos de adenosina, sendo descritos oito membros presente na membrana plasmática (NTPDase1, 2, 3 e 8), no lúmen de organelas celulares (NTPDase 4 e 7), no meio intracelular ou presentes no meio extracelular (NTPDase 5 e 6) (YEGUTKIN, 2014; ZIMMERMANN, 2020). Esses membros não somente diferem na localização, mas também na preferência por hidrolizar di- ou trinucleotídeos. As NTPDase1, 3 e 8 têm preferência por hidrolisar ATP e ADP similarmente, enquanto a NTPDase 2, expressa majoritariamente em astrócitos, têm preferência maior por hidrolisar ATP – mantendo sua atividade inclusive quando cristalizada (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; WINK *et al.*, 2006; ZEBISCH; STRÄTER, 2008).

### **3.6.2. Ecto-5'-nucleotidase**

A Ecto-5'-nucleotidase (eN), é uma glicoproteína presente na membrana citoplasmática, sendo considerada uma enzima-chave na cascata hidrolítica das ectonucleotidases por ser a enzima responsável pela hidrólise de AMP à adenosina, que pode ser novamente convertida a AMP intracelularmente, o que permite a conservação do conteúdo de purinas na célula (LANGER *et al.*, 2008; ZIMMERMANN, 2021). Além dos efeitos mencionados acima, a adenosina produzida pela ação de eN apresenta um papel imunossupressor, diminuindo o recrutamento de células de defesa, e a redução ou ausência da eN levam à diminuição do tempo de vida de camundongos (ALCEDO; BOWSER; SNIDER, 2021).

## 4. Resultados

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. As seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens discussão e conclusões que se encontram no final desta tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados descritos no manuscrito.

O manuscrito está estruturado de acordo com as revistas a qual foi submetido *Celular and Molecular Neurobiology*.

### 4.1. Manuscrito

#### **Effect of 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one against lipopolysaccharide–induced oxidative damage and alterations in cholinergic and purinergic signaling in cultured astrocytes**

Fernando Lopez Alvez<sup>1</sup>, Natália Pontes Bona<sup>2</sup>, Nathalia Stark Pedra<sup>1</sup>, Daniel Schuch da Silva<sup>3</sup>, Wilson João Cunico<sup>3</sup>, Francieli Moro Stefanello<sup>2</sup>, Cinthia Melazzo de Andrade<sup>4</sup>, Mayara Sandrielly Pereira Soares<sup>1</sup>, Roselia Maria Spanevello<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Laboratório de Análises Clínicas Veterinário, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

\* Corresponding author

Roselia Maria Spanevello: Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 9601090, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355 Email: [roselia.spanevello@ufpel.edu.br](mailto:roselia.spanevello@ufpel.edu.br)

## ORCID

Fernando Lopez Alvez: <https://orcid.org/0000-0002-8905-8078>

Natália Pontes Bona: <https://orcid.org/0000-0001-5944-1968>

Nathalia Stark Pedra: <https://orcid.org/0000-0001-8662-7661>

Wilson João Cunico: <https://orcid.org/0000-0003-2577-5323>

Francieli Moro Stefanello: <https://orcid.org/0000-0001-5945-3723>

Mayara Sandrielly Pereira Soares: <https://orcid.org/0000-0002-2181-3591>

Roselia Maria Spanevello: <https://orcid.org/0000-0002-5117-2000>

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul. This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES - Finance code 001). R.M.S are recipients of the CNPq fellowship.

## Declarations

**Funding:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS—PRONEM processo: 16/2551–0000 2452).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Authors' Contribution

Fernando L. Alvez: Astrocyte culture and treatment, biochemical analysis, statistical analysis, discussion, and manuscript preparation.

Natália P. Bona and Nathalia S. Pedra: Astrocyte treatment and oxidative stress analysis.

Daniel S. da Silva and Wilson Cunico: DS27 design and synthesis.

Francieli M. Stefanello, Mayara S. P. Soares, Cinthia M. Andrade: Results interpretation and manuscript preparation.

Roselia Spanevello: Experimental design, results analysis and manuscript preparation.

Roselia Spanevello, Cinthia M. Andrade, Wilson Cunico: Financial support.

**Ethics Approval:** All animal procedures were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil, under the number CEEA 46528-2018 and followed the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DCBA 2013) and the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA)



## Abstract

Astrocytes play multiple important roles in brain physiology. However, depending on the stimuli, astrocytes may exacerbate inflammatory reactions, contributing to the development and progression of neurological diseases. Therefore, therapies targeting astrocytes represent a promising area for the development of new brain drugs. Thiazolidinones are heterocyclic compounds that have a sulfur and nitrogen atom and a carbonyl group in the ring and represent a class of compounds of great scientific interest due to their pharmacological properties. The aim of this study was to investigate the effect of 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one (DS27) on cell proliferation and morphology, oxidative stress parameters, activity of the enzymes ectonucleotidases and acetylcholinesterase (AChE) and interleukin 6 (IL-6) levels in primary astrocyte cultures treated with lipopolysaccharide (LPS), to model neuroinflammation. The astrocyte culture was exposed to LPS (10 µg/ml) for 3 h and subsequently treated with compound DS27 for 24 and 48 h (concentrations ranging to 10-100 µM). LPS induced an increase in astrocyte proliferation, AChE activity, IL-6 levels, oxidative damage, ATP and ADP and a reduction in AMP hydrolysis in rat primary astrocyte cultures. DS27 treatment was effective in reversing these alterations induced by LPS. Our findings demonstrated that DS27 is able to modulate cholinergic and purinergic signaling, redox status, and the levels of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced astrocyte damage. These glioprotective effects of DS27 may be very important for improving neuroinflammation, which is associated with many brain diseases.

**Keywords:** Thiazolidinone, Astrocytes, Oxidative Stress, Neuroinflammation, Acetylcholinesterase, Ectonucleotidases

## Introduction

The central nervous system (CNS) relies on two types of resident cells, microglia and astrocytes, to defend and protect the tissue in cases of injury or infection (Glass et al. 2010). Astrocytes were once considered to be just a scaffold for neurons; however, nowadays, it is recognized that they participate in numerous processes related to brain development, ion and neurotransmitter homeostasis, metabolic waste clearance, and defense against injuries (Stevenson et al. 2020). Astrocytes are glial cells with a plethora of roles that converge to maintain general brain homeostasis while also express an assortment of receptors and cytokines involved in the innate immune system response (Verkhatsky and Nedergaard 2018).

Neuroinflammation is a nonspecific immune reaction within the CNS, involving the reactive phenotype of glial cells, mainly astrocytes and microglia. The outcome of a neuroinflammatory response depends in part on its severity and duration (Shabab et al. 2017). In particular, astrocytes can release inflammatory mediators such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), thus playing a crucial role in neuroinflammation (Van Kralingen et al. 2013; Sofroniew 2014). In addition, activated astrocytes are an important source of reactive oxygen species (ROS), which may contribute to immune activation, excessive inflammation, and oxidative stress (Johnstone et al. 1999; Sheng et al. 2013). Thus, depending on the stimuli, astrocytes may exacerbate inflammatory reactions leading to tissue damage, contributing to the initiation and progression of many neurological diseases (Colombo and Farina 2016; Kaur et al. 2019).

Adenine nucleotides and nucleosides, such as adenosine triphosphate (ATP) and adenosine, are key molecules involved in purinergic signaling in brain physiology and pathological conditions (Burnstock 2020). Degradation of extracellular ATP by ectonucleotidases is an important regulatory mechanism of the purinergic system by modulating ligand availability at nucleotide and nucleoside receptors (Zimmermann 2021a). Astrocytes possess all the components of the purinergic system and are the major source of extracellular adenine nucleotides (Puchalowicz et al. 2015). Astrocytic signaling involving adenine nucleotides and nucleosides and their receptors plays a significant role in brain cell communication, regulation of other glial cells, and neurotransmission (Tozaki-Saitoh et al. 2011). In addition, extracellular ATP can activate astrocytes and induce a neuroinflammatory response (Tozaki-Saitoh et al. 2011).

Considering that astrocytes are the largest population of glial cells and they represent an important regulator of brain functions, targeting astrocytic functions represents a promising area for the development of new brain drugs. Thiazolidinones are heterocyclic compounds that have a sulfur atom as well as a nitrogen atom and a carbonyl group in the ring, and their derivatives have different chemical, physical, and pharmacological properties (Nirwan et al. 2019). Among their derivatives, 4-thiazolidinones, having a carbonyl group at position 4, have been studied extensively because they have shown promising antitumor activity (Da Silveira et al. 2019). Recently, thiazolidin-4-ones have emerged as a class of compounds with anticholinesterase activity (Da Silva et al. 2020, 2021). Da Silva et al. (2021) also demonstrated the ability of thiazolidin-4-ones to protect against oxidative damage and alterations in ion pump activity in the cerebral cortex and hippocampus of a rat model of memory deficit.

Lipopolysaccharide (LPS), a molecule present in the outer membrane of gram-negative bacteria, is used to induce neuroinflammation in astrocytes and to investigate new therapeutic alternatives for neurodegenerative diseases (Batista et al. 2019). Thus, the aim of this study was to investigate the effect of 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one (DS27) on cell proliferation and morphology, oxidative stress parameters, IL-6 levels, and the activity of ectonucleotidases and AChE in primary cultured astrocytes treated with LPS to model neuroinflammation.

## **Materials and Methods**

### **Chemicals**

LPS from *Escherichia coli* (055:B5) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 3-(3-(diethylamino)propyl)-2-(4-(methylthio)phenyl)thiazolidin-4-one (DS27) was synthesized according Da Silva et al. (2016) and was accurately identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and were of the highest purity.

### **Animals**

Newborn Wistar rats (1-2 days old) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal de Pelotas and were maintained under a standard 12-h dark-light cycle in a controlled temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). All animal procedures were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pelotas under protocol number CEEA 46528-2018, and were in accordance with the



Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DCBA 2013) and the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

### **Astrocytes primary culture**

Primary astrocyte cultures were prepared as described by Gottfried et al. (1999), with minor modifications. The newborn (1–2 days old) *Wistar* rats were euthanized, their brains were removed, the cerebral cortex was separated, and the meninges were removed. The cerebral cortex was then mechanically dissociated by pipetting in a calcium- and magnesium-free balanced salt solution (pH 7.4) to form a cell suspension. The cell suspension was centrifuged at 1000 rpm or 10 min, and the cell pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (pH 7.6). Subsequently, the cells were seeded in 6-, 48-, and 96-well poly-L-lisine pretreated plates. Four hours after seeding, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) solution, and fresh medium was added. Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 20 days until confluence for cell maturation and differentiation, with the medium being changed every four days.

### **Astrocyte treatment with LPS and DS27**

The primary astrocyte cultures were first exposed to 10 µg/ml LPS for 3 h. Thereafter, the LPS-containing medium was removed and new medium containing different concentrations of DS27 was added to each group for 24 and 48 h (Figure 1). A stock solution of DS27 was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to obtain final concentrations of 10, 25, 50, and 100 µM/ml, so that the percentage of DMSO per ml of medium to be less than 1%. The control cells were maintained in DMEM with 10% FBS and 15 µl of DMSO per ml of medium.

### **Cell proliferation assay and assessment of cell morphology**

The cell proliferation assay was performed using sulforhodamine B (SRB) dye. Briefly, astrocytes cultured in 96-well plates were washed and fixed in 50% trichloroacetic acid (TCA) for 45 min at 4°C. After washing the cells five times with distilled water, 0.4% SRB dye diluted in acetic acid was added to the cells for 30 min. To remove the unbound dye, the cells were washed five times with 1% acetic acid solution. Finally, the dye was dissolved with 10 mM Tris solution, and the absorbance was read at

530 nm. For the morphology evaluation, astrocytes cultured in 6-well plates were observed and photographed with an inverted microscope at 24 and 48 h prior biochemical analysis.

### **Acetylcholinesterase (AChE) activity**

AChE activity was determined as described by Ellman et al. (1961), with minor modifications. The cell lysate was prepared in PBS, and the cells were mechanically lysed with the aid of a scraper. First, the reaction was composed of 10 mM 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid] (DTNB), 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), and 15  $\mu$ L of cell lysate, which were incubated for 2 min at 27°C. Subsequently, 8 mM acetylthiocholine (AcSCh) was added to the reaction, and the absorbance was determined for 2 min at 30-s intervals at 27°C. All readings were performed in triplicate, and AChE activity was expressed as  $\mu$ mol AcSCh/h/mg of protein.

### **Ectonucleotidase assay**

For the NTPDase activity, using ATP and ADP as substrates, as well as the 5-nucleotidase activity, using AMP as substrate, astrocytes cultured in 48-well plates were washed three times with phosphate-free incubation medium. The enzymatic reaction was initiated by the addition of 200  $\mu$ L of incubation medium containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  for the ATPase and ADPase assay or 2 mM  $\text{MgCl}_2$  for the AMPase assay, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES (pH 7.4), and 2 mM ATP, ADP, or AMP as substrates. After a 10 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by transferring an aliquot of the incubation medium to a pre-cooled tube containing TCA (final concentration 5 % w/v). The release of inorganic phosphate (Pi) was measured by the malachite green method (Chan et al. 1986), using  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as a Pi standard. Controls to determine the non-enzymatic Pi release were performed by incubating the substrates in the absence of the cells. All assays were performed in triplicates. The specific activity of the enzyme was expressed as a percentage of the control.

### **Oxidative stress parameters**

#### **Reactive oxygen species (ROS) assay**

ROS formation was determined according to Santos et al. (2017) using the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. In this reaction, DCFH-DA

reacts with ROS to form an intermediate that emits fluorescence. Briefly, intact cells were incubated with 1  $\mu$ M DCFH-DA for 30 min at 37°C, and fluorescence was determined at 485/520 nm. ROS production was reported as the percentage of the untreated cells (control).

#### **Total sulfhydryl content (SH)**

The total SH was determined in astrocyte lysates using the DTNB method, as described by Aksenov and Markesbery (2001). The reaction based on thiols, which reduced the DTNB reagents, resulting in a yellow intermediate (TNB), whose absorption at 412 nm correlates to the total content of SH groups. The results are expressed in nmol TNB/mg of protein.

#### **Nitrite levels**

The production of nitrite was determined in the cell culture supernatants according to the method of Stuehr and Nathan, (1989) with modifications. First, sulfanilamide in 5% phosphoric acid was added to cell culture supernatants, followed by incubation at room temperature for 10 min. Subsequently, Griess reagent (0.1% N-[1-naphthyl] ethylenediamine dihydrochloride) was added to the samples and incubated for 10 min in the dark. The absorbance was measured at 540 nm, and a standard curve of sodium nitrate was used to determine the levels of nitrite in the samples.

#### **Superoxide dismutase (SOD) assay**

The SOD activity was measured in the lysates according to the method of Misra & Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation. The specific activity of SOD is reported as units/mg of protein.

#### **Catalase (CAT) assay**

CAT activity was measured according to the method of Aebi (1984). The reaction was based on the decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> monitored at 240 nm. CAT activity is reported as units/mg of protein.

#### **Glutathione peroxidase (GPx) assay**

GPx activity was measured using a commercial kit (Randox Laboratories Ltd., UK according to the manufacturer's instructions. GPx activity is reported as units of GPx/mg of protein activity.

### **Glutathione S-transferase (GST)**

GST activity was measured as described by Habig et al. (1974). The assay medium consisted of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) substrate diluted in ethanol, 10 mM glutathione (GSH), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 20  $\mu$ l cell lysate. GST activity is expressed as a percentage relative to the control.

### **Protein determination**

Protein determination was performed according to the Coomassie blue method (Bradford 1976) for AChE and ectonucleotidase assays or according to Lowry et al. (1951) for the oxidative stress parameters. Bovine serum albumin was used as the standard for both methods.

### **Estimation of interleukin 6 levels (IL-6)**

IL-6 levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The concentration of IL-6 was determined according to the manufacturer's instructions and expressed as pg/mg protein.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Furthermore, all data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean, and the differences between the mean values were considered significant at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Cell viability, proliferation, and morphological analysis**

LPS induced an increase in astrocyte proliferation at both time points evaluated (24  $P < 0.05$  and 48 h  $P < 0.05$ ). At 24 h, DS27 was capable of reducing astrocyte proliferation only at the two highest concentrations evaluated (50 and 100  $\mu$ M) ( $P < 0.05$ ), whereas at 48 h, DS27 was capable of reducing astrocyte proliferation 10 ( $P < 0.01$ ), 25 ( $P < 0.05$ ), 50 ( $P < 0.05$ ) and 100 ( $P < 0.01$ )  $\mu$ M (Figure 2). In addition, astrocytes exposed to LPS and treated with DS27 (10  $\mu$ M) displayed more abundant cells with small cytoplasm. Interestingly, when astrocytes exposed to LPS were treated with DS27 (100  $\mu$ M), fewer cells were observed than the group exposed to DS27 (10  $\mu$ M); however, these cells

appeared to be more mature, had larger cytoplasm, and emitted numerous projections, similar to cells of the control group (Figure 3).

### **Acetylcholinesterase (AChE) activity**

As seen in Figure 4, LPS induced an increase in AChE enzyme activity in astrocyte cultures at both 24h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.001$ ). The compound DS27 was able to prevent this LPS-induced alteration in AChE activity at all concentrations evaluated in 24h (all concentrations  $P < 0.001$ ) and 48 h (10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ )).

### **ATP, ADP and AMP hydrolysis**

Regarding ATP hydrolysis, LPS induced an increase at 24 h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.001$ ) (Figure 5). DS27 was capable of preventing this change only at concentrations of 50 ( $P < 0.05$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ) at 24 h and at all concentrations evaluated at 48 h (10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ )) (Figure 5).

LPS also induced an increase in ADP hydrolysis at both time points 24h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.05$ ). DS27 was able to prevent these alterations in ADP hydrolysis at all concentrations evaluated only at 24 h (10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ )). DS27 did not prevent LPS-induced alterations in ADP hydrolysis in rat astrocyte cultures at 48 h ( $P > 0.05$ ) (Figure 5). LPS caused a reduction in the hydrolysis of AMP hydrolysis at both time points tested (24 h ( $P < 0.001$ ) and 48 h ( $P < 0.001$ )). After 24 h of treatment, DS27 was not able prevent LPS-induced changes in AMP hydrolysis ( $P > 0.05$ ). However, at 48 h, treatment with 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) of DS27 prevented LPS-induced changes in AMP in rat primary astrocyte cultures (Figure 5).

### **Oxidative Stress Parameters**

LPS treatment resulted in an increase in ROS levels in astrocyte cultures at both 24h ( $P < 0.001$ ) and 48 h ( $P < 0.001$ ). In comparison, treatment with DS27 at all concentrations tested 10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) reduced ROS levels at 24 h and 48 h (10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ )) (Figure 6). Similar results were observed for nitrite levels, which were significantly increased by LPS at both 24 ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.05$ ). In addition, this effect on nitrite levels was prevented by DS27 treatment with 25

$\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ) at 24 h, whereas it was prevented by all concentrations evaluated at 48 h (10  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ )) (Figure 6). Exposure to LPS resulted in a significant reduction in SH levels at both 24 and 48 h compared to control cells ( $P < 0.01$ ) (Figure 6). However, treatment with DS27 was not able to protect against SH level reduction at any concentration tested ( $P > 0.05$ ) (Figure 6).

The results concerning the activities of antioxidant enzyme are shown in Figure 7. First, a significant reduction in SOD activity was observed in cells exposed to LPS compared to control cells at both time points (24 h ( $P < 0.05$ ) and 48 h ( $P < 0.01$ )) (Figure 7). Treatment with DS27 (10-100  $\mu\text{M}$ ) did not protect against this change at any of the time points evaluated ( $P > 0.05$ ) (Figure 7). Regarding CAT activity, it was observed that only the highest concentration of DS27 compound (100  $\mu\text{M}$ ) was able to protect against the LPS-induced reduction in CAT activity at 24 h ( $P < 0.05$ ). At 48 h, no significant changes in CAT activity were observed in any of the experimental conditions ( $P > 0.05$ ) (Figure 7).

Furthermore, LPS treatment resulted in a decrease in GPx activity in astrocyte cultures at both time points (24 h ( $P < 0.01$ ) and 48 h ( $P < 0.05$ )) in comparison to control cells (Figure 7). DS27 did not protect against this alteration at 24 h ( $P > 0.05$ ). However, after 48 h of treatment with 50 and 100  $\mu\text{M}$  DS27, a significant increase in GPx activity in astrocytes compared to the LPS group ( $P < 0.05$ ) was observed (Figure 7). As for GST activity, an increase was observed in astrocytes exposed to LPS ( $P < 0.05$ ) at 24 h in comparison to control cells, and this increase was reversed by treatment with even the lowest concentration of 10  $\mu\text{M}$  DS27 (Figure 7). After 48 h, there was a reduction in GST activity in LPS-challenged cells ( $P < 0.05$ ), and this alteration was not prevented by any concentration of DS27 tested ( $P > 0.05$ ) (Figure 7).

## **IL-6 levels**

In relation to IL-6 levels, our results showed that LPS induced an increase in astrocyte cultures only at 48 h ( $P < 0.0001$ ). DS27 prevented this increase in IL-6 ( $P < 0.001$  for all concentrations tested 10-100  $\mu\text{M}$ ) after 48 h (Figure 8). No changes were observed in IL-6 levels in rat primary astrocyte cultures at 24 h in any of the evaluated treatments (Figure 8).

## Discussion

In this study, we demonstrated the protective effects of DS27 against LPS-induced morphological and biochemical changes in rat primary astrocyte cultures. Our results regarding the effect of LPS on astrocyte cultures corroborate with previous studies from our research group, which also demonstrated that LPS (1 µg/ml) induced cell proliferation and oxidative damage, increased AChE activity, and induced morphological changes in rat primary astrocytes after 3 h of exposure (Pacheco et al. 2018). In addition, previous studies have shown that LPS induced the expression of TNF $\alpha$  in astrocytes in a dose-dependent manner, reaching a peak in 4 h (Rodgers et al. 2020). Patel et al. (2017) also reported that mice astrocytes exposed to 60 ng/ml of LPS showed an increase in NF- $\kappa$ B nuclear translocation after 3 h. This is of particular importance, as the activation of NF- $\kappa$ B by LPS induces increases in cytokine nitric oxide (NO), and ROS production (Xu et al. 2017; Kang et al. 2019). In fact, this mechanism can explain, at least in part, the alterations in redox status parameters observed in astrocytes exposed to LPS in our study.

TNF $\alpha$  is an important regulator of cell survival, apoptosis, and necroptosis through its direct impact on the regulation of NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK). However, there is now an increasing interest in understanding the emerging function of TNF $\alpha$  as a regulator of the generation of reactive nitrogen species (RNS) and ROS, which could be derived from either mitochondrial or non-mitochondrial sources (Blaser et al. 2016). In astrocytes, the major source of ROS is the mitochondrial respiratory chain, because they form less super complexes between complex I and complex III, which leads to the production of more superoxide by astrocytic rather than neuronal mitochondria (Lopez-Fabuel et al. 2016).

Our study showed an increase in nitrite levels in astrocyte cultures treated with LPS. This finding is in accordance with the study of Patel et al. (2017), who also observed an increase in nitrite levels in astrocytes after 24 h of exposure to LPS. Nitrite (NO<sup>2-</sup>) is the end product of NO metabolism. NO has a short half-life in vivo, but high concentrations of this molecule together with high concentrations of oxygen or superoxide anions in lipophilic environments accelerate autoxidation of NO to NO<sup>2-</sup>, and both of these molecules are involved in oxidative nitrosylation (Heinrich et al. 2013; Möller et al. 2019). Nitrosylation is very important in the mitochondrial context. However, while few proteins of the mitochondrial proteome are s-nitrosylated, this modification alters the activities of certain proteins pertaining to the electron transport chain, as it is

for complex I, the major source of superoxide, which becomes inhibited (Piantadosi 2012). Such inhibition could be positive if it leads to a decrease in superoxide production, but it has been shown that sustained inhibition of complex I in a milieu depleted of glutathione (GSH), the predominant cellular thiol source, increases superoxide production (Dahm et al. 2006). In accordance, here we demonstrated that LPS decreased the levels of thiol in astrocytes in both time points evaluated, and considering that thiol content indirectly reflects the GSH cellular status, our findings suggest that LPS may decrease GSH content while promoting protein nitrosylation.

The reduction in SOD, CAT, and GPx activities in astrocytes exposed to LPS can contribute to the elevated ROS levels observed in our study. It has been shown that activation of Toll-like receptor 4 by LPS leads to activation of NF- $\kappa$ B, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 1 (JAK1/STAT1) pathways in astrocytes, which in turn downregulate the copper-zinc-containing SOD (Gorina et al. 2011). However, LPS has also been shown to suppress the gene and protein levels of GPx and CAT (Kucukgul and Erdogan 2017; Kim et al. 2020).

The compound DS27 prevented the LPS-induced increase in ROS and nitrite levels in astrocytes. However, concerning antioxidant enzymes, DS27 was capable of preventing alterations only in CAT, GPx, and GST, mainly at the higher concentrations evaluated. Our findings are in accordance with data from other studies that also demonstrated that thiazolidin-4-ones have radical scavenging activity (Isloor et al. 2013; Apotrosoaei et al. 2014; Bosenbecker et al. 2014) and are capable of reducing lipid peroxidation and increasing total thiols in biological systems (Bosenbecker et al. 2014). In addition, da Silva et al. (2021) also demonstrated the ability of thiazolidin-4-ones to protect against brain oxidative damage in a rat model of memory deficit.

The AChE enzyme is responsible for rapidly hydrolyzing acetylcholine into acetic acid and choline. Although the hallmark of AChE is its catalytic activity, it is also involved in cell adhesion and proliferation, neurite outgrowth, and glial activation (Ballard et al. 2005; Silman and Sussman 2005). Acetylcholine is an important neurotransmitter in the CNS, an astrocytic mitogen, and an anti-inflammatory molecule (Guizzetti et al. 1996). Previous studies have shown that glial fibrillary acidic protein synthesis and mRNA expression were reduced when rat glioma differentiation-induced C6 cells were treated with acetylcholine (Ozawa et al. 2019). In addition, mice treated with an agonist for the nicotinic acetylcholine receptor showed reduced NF- $\kappa$ B nuclear



translocation, thereby diminishing TNF- $\alpha$  secretion and expression (Patel et al. 2017). Of particular importance, it has been demonstrated that acetylcholine protected against LPS induced neuronal injury by regulating the release of the microglial pro-inflammatory factors, including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Li et al. 2019). Here, we showed that LPS induced an increase in AChE activity in astrocytes, which should lead to a decrease in acetylcholine levels, further contributing to the glioinflammatory process.

Treatment with DS27 was effective in preventing alterations in AChE activity induced by LPS in astrocytes. In fact, DS27 has a chemical structure similar to acetylcholine; therefore, it is expected that this compound acts as an AChE inhibitor, as shown in previous studies by our research group (da Silva et al. 2020). Based on our results, we suggest that inhibition of AChE activity in astrocytes by DS27 could increase acetylcholine levels, an anti-inflammatory molecule, leading to inhibition of the secretion of pro-inflammatory cytokines. In addition, previous studies have shown a decrease in nitrite levels in astrocytes exposed to LPS and treated with a nicotinic receptor agonist (Patel et al. 2017). Thus, it is plausible that the effects of DS27 on the decrease in nitrite levels observed in our study could be related to its ability to inhibit AChE activity in astrocytes, increasing the levels acetylcholine, which is able to interact with nicotinic receptors.

LPS also induced an increase in ATP and ADP hydrolysis in astrocytes at both time points evaluated (24 and 48 h). Ecto-nucleoside triphospho diphosphohydrolases (NTPDases) are enzymes capable of hydrolyzing triphosphates and diphosphates into monophosphates and can be located on the cell surface (NTPDase1-3 and NTPDase 8), organelles (NTPDase 4-7), or be secreted (NTPDase 5 and NTPDase 6) (Zimmermann et al. 2012). Rat astrocytes in culture express on their surface mainly NTPDase 2, which hydrolyzes ATP to ADP (Heine et al. 1999; Kukulski et al. 2005; Wink et al. 2006; Zebisch and Sträter 2008). Brisevac et al. (2013) showed that rat astrocyte cultures exposed to LPS (0.1  $\mu$ g/ml) for 24 h predominantly expressed NTPDase 2 and showed an increase in ATP and no changes in ADP hydrolysis due to upregulation of NTPDase 2. In contrast, our results show that ATP and ADP have similar hydrolysis profiles in the LPS group, suggesting the participation of other enzymes in adenine nucleotide hydrolysis in addition to NTPDase 2. Consistent with this hypothesis, we also showed that DS27 reduced ATP and ADP hydrolysis at 24 h. However, at 48 h, DS27 was capable of preventing alterations in ATP hydrolysis in the LPS group, suggesting that this compound can have a more selective effect on NTPDase 2, modulating its expression or

activity. However, more studies are necessary to elucidate the effects of DS27 on the NTPDase enzyme family in astrocytes.

Concerning AMP hydrolysis, LPS induced a reduction in the hydrolysis of this nucleotide at both time points evaluated (24 and 48 h). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a glycoprotein that catalyzes the breakdown of AMP to adenosine and acts as a key enzyme in the ectonucleotidase cascade (Langer et al. 2008; Zimmermann 2021b). Adenosine has been shown to inhibit or activate this enzyme through A1, A3, or A2A and A2B receptors (Cunha 2005), and reactive astrocytes display an increase in ecto-5'-nucleotidase production (Bjelobaba et al. 2011).

Previous studies have demonstrated that treatment of rat primary astrocytes, with LPS (0.1 µg/ml) for 24 h induced a reduction in ecto-5'-nucleotidase activity and expression (Brisevac et al. 2012). Here, we also showed a decrease in ecto-5'-nucleotidase activity in astrocytes exposed to LPS. A possible explanation for this alteration is the increase in ROS levels observed in the LPS group. Data from the literature have documented that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced the ecto-5'-nucleotidase activity in astrocyte cultures (Brisevac et al. 2012, 2013). Our results showed that DS27 was capable of preventing alterations in 5'-nucleotidase activity only at 48 h. This effect of DS27 on NTPDase and 5'-nucleotidase can terminate ATP signaling (a pro-inflammatory molecule) and trigger adenosine signaling (an anti-inflammatory and immunosuppressive molecule), contributing to a decrease in astrocyte damage induced by LPS (Bours et al. 2006).

In fact, we observed that DS27 reduced IL-6 levels in astrocytes exposed to LPS for 48 h. The differences in the response patterns of IL-6 at the time points evaluated (24 and 48 h) following LPS exposure were due to the concentration and time profiles and cytokine cross regulation (Van Wagoner and Benveniste 1999; Lomenick et al. 2011). Izeboud et al. (1999) showed that TNF-α reached maximum levels at approximately 3 h after LPS exposure and returned to basal levels within 24 h, while the increase in IL-6 levels started later than that of TNF-α. Considering that IL-6 is a mediator of inflammation and astrogliosis (Van Wagoner and Benveniste 1999), here we showed that DS27 potently suppresses LPS-induced release of this pro-inflammatory cytokine.

In conclusion, we showed for the first time the glioprotective effect of DS27 in rat primary astrocytes exposed to LPS. DS27 was capable of modulating cholinergic and purinergic signaling, redox status, and the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6. Our results suggest that DS27 is a promising multitarget compound that may have

beneficial effects in the treatment of neurological diseases associated with neuroinflammation.

## References

- Aebi H (1984) [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- Apotrosoaei M, Vasincu I, Constantin S, et al (2014) Synthesis, characterization and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-one derivatives. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 118:213–8
- Ballard C, Greig N, Guillozet-Bongaarts A, et al (2005) Cholinesterases: Roles in the Brain During Health and Disease. *Curr Alzheimer Res* 2:307–318. <https://doi.org/10.2174/1567205054367838>
- Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, et al (2019) Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- Bjelobaba I, Parabucki A, Lavrња I, et al (2011) Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *J Neurosci Res* 89:862–873. <https://doi.org/10.1002/jnr.22599>
- Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D (2016) TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol* 26:249–261. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002>
- Bosenbecker J, Bareño VDO, Difabio R, et al (2014) Synthesis and Antioxidant Activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *J Biochem Mol Toxicol* 28:425–432. <https://doi.org/10.1002/jbt.21581>
- Bours MJL, Swennen ELR, Di Virgilio F, et al (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112:358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle 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)

- Brisevac D, Bajic A, Bjelobaba I, et al (2013) Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro. *J Mol Neurosci* 51:871–879. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0088-3>
- Brisevac D, Bjelobaba I, Bajic A, et al (2012) Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. *Neurochem Int* 61:681–688. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.017>
- Burnstock G (2020) Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. In: Barańska J (ed) *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2nd edn. Springer, Cham, pp 1–12
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90640-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90640-8)
- Colombo E, Farina C (2016) Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37:608–620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal* 1:111–134. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-0649-1>
- da Silva DS, da Silva CEH, Soares MSP, et al (2016) Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* 124:574–582. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>
- da Silva DS, Soares MSP, Martini F, et al (2020) In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. *Neurochem Res* 45:241–253. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02929-8>
- da Silva DS, Soares MSP, Teixeira FC, et al (2021) Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. *Neurochem Res* 46:1554–1566. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03295-0>
- da Silveira EF, Ferreira LM, Gehrcke M, et al (2019) 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. *Cell Mol Neurobiol* 39:783–797.

<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00678-4>

- Dahm CC, Moore K, Murphy MP (2006) Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: Implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem* 281:10056–10065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512203200>
- dos Santos LM, da Silva TM, Azambuja JH, et al (2017) Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. *Mol Cell Biochem* 424:69–78. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2843-6>
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Glass CK, Saijo K, Winner B, et al (2010) Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* 140:918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, et al (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59:242–255. <https://doi.org/10.1002/glia.21094>
- Gottfried C, Valentim L, Salbego C, et al (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833:142–149. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01503-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01503-6)
- Guizzetti M, Costa P, Peters J, Costa LG (1996) Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur J Pharmacol* 297:265–273. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00746-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00746-6)
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 262:102–107. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00347.x>
- Heinrich TA, Da Silva RS, Miranda KM, et al (2013) Biological nitric oxide signalling:

- Chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* 169:1417–1429. <https://doi.org/10.1111/bph.12217>
- Isloor AM, Sunil D, Shetty P, et al (2013) Synthesis, characterization, anticancer, and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-ones in MCF-7 cells. *Med Chem Res* 22:758–767. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0071-5>
- Izeboud CA, Mocking JAJ, Monshouwer M, et al (1999) Participation of  $\beta$ -Adrenergic Receptors on Macrophages in Modulation of LPS-Induced Cytokine Release. *J Recept Signal Transduct* 19:191–202. <https://doi.org/10.3109/10799899909036645>
- Johnstone M, Gearing AJH, Miller KM (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to  $\beta$ - amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93:182–193. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00226-4)
- Kang J-B, Park D-J, Shah M-A, et al (2019) Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF- $\kappa$ B activation in cerebral cortex of adult mice. *Lab Anim Res* 35:1–8. <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0018-9>
- Kaur D, Sharma V, Deshmukh R (2019) Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology* 27:663–677. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00580-x>
- Kim CY, Yu QM, Kong HJ, et al (2020) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Extract. *Evidence-based Complement Altern Med* 2020:. <https://doi.org/10.1155/2020/8571207>
- Kucukgul A, Erdogan S (2017) Low concentration of oleic acid exacerbates LPS-induced cell death and inflammation in human alveolar epithelial cells. *Exp Lung Res* 43:1–7. <https://doi.org/10.1080/01902148.2016.1267823>
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie ÉG, et al (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1:193–204. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, et al (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199–217. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0681-x>
- Li L, Liu Z, Jiang YY, et al (2019) Acetylcholine suppresses microglial inflammatory response via  $\alpha 7$ nAChR to protect hippocampal neurons. *J Integr Neurosci* 18:51–56. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.01.114>
- Lomenick B, Jung G, Wohlschlegel JA, Huang J (2011) Target Identification Using Drug

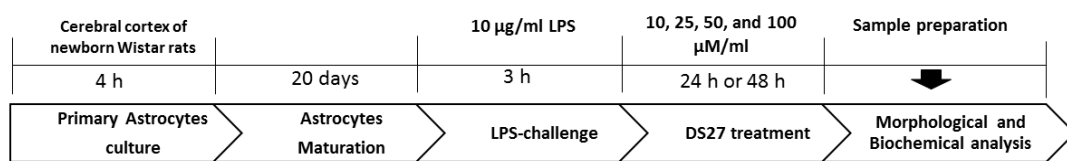
- Affinity Responsive Target Stability (DARTS). *Curr Protoc Chem Biol* 3:163–180. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110180>
- Lopez-Fabuel I, Le Douce J, Logan A, et al (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci* 113:13063–13068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113>
- Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R (1951) Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9)
- Möller MN, Rios N, Trujillo M, et al (2019) Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem* 294:14776–14802. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>
- Nirwan S, Chahal V, Kakkar R (2019) Thiazolidinones: Synthesis, Reactivity, and Their Biological Applications. *J Heterocycl Chem* 56:1239–1253. <https://doi.org/10.1002/jhet.3514>
- Ozawa A, Kadowaki E, Horio T, Sakaue M (2019) Acetylcholine suppresses the increase of glia fibrillary acidic protein expression via acetylcholine receptors in cAMP-induced astrocytic differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 698:146–153. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.020>
- Pacheco SM, Soares MSP, Gutierrez JM, et al (2018) Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *J Nutr Biochem* 56:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>
- Patel H, McIntire J, Ryan S, et al (2017) Anti-inflammatory effects of astroglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors are mediated by inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway and activation of the Nrf2 pathway. *J Neuroinflammation* 14:192. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0967-6>
- Piantadosi CA (2012) Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1820:712–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.008>
- Puchalowicz K, Baranowska-Bosiacka I, Dziedziejko V, Chlubek D (2015) Purinergic

- signaling and the functioning of the nervous system cells. *Cell Mol Biol Lett* 20:867–918. <https://doi.org/10.1515/cmb-2015-0050>
- Rodgers KR, Lin Y, Langan TJ, et al (2020) Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Sci Rep* 10:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63766-2>
- Shabab T, Khanabdalil R, Moghadamtousi SZ, et al (2017) Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci* 127:624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Sheng WS, Hu S, Feng A, Rock RB (2013) Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochem Res* 38:2148–2159. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1123-z>
- Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 5:293–302. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.01.014>
- Sofroniew M V. (2014) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist* 20:160–172. <https://doi.org/10.1177/1073858413504466>
- Stevenson R, Samokhina E, Rossetti I, et al (2020) Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 14:1–23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00278>
- Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543–1555. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>
- Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K (2011) Role of Purinergic Receptors in CNS Function and Neuroprotection. In: Jacobson KA, Linden J (eds) *Advances in Pharmacology*, 1st edn. Elsevier Inc., pp 495–528
- Van Kralingen C, Kho DT, Costa J, et al (2013) Exposure to inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  induces compromise and death of astrocytes; implications for chronic neuroinflammation. *PLoS One* 8:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084269>
- Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100:124–139. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00187-3)
- Verkhatsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of astroglia. *Physiol Rev* 98:239–389.

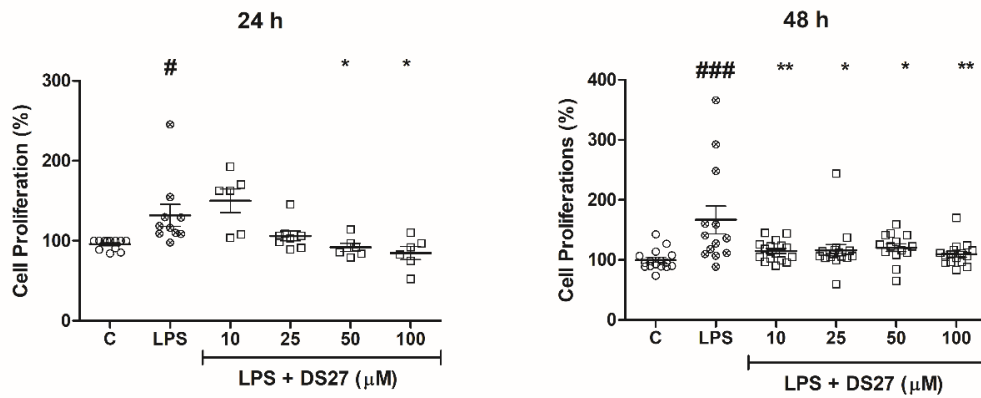


<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

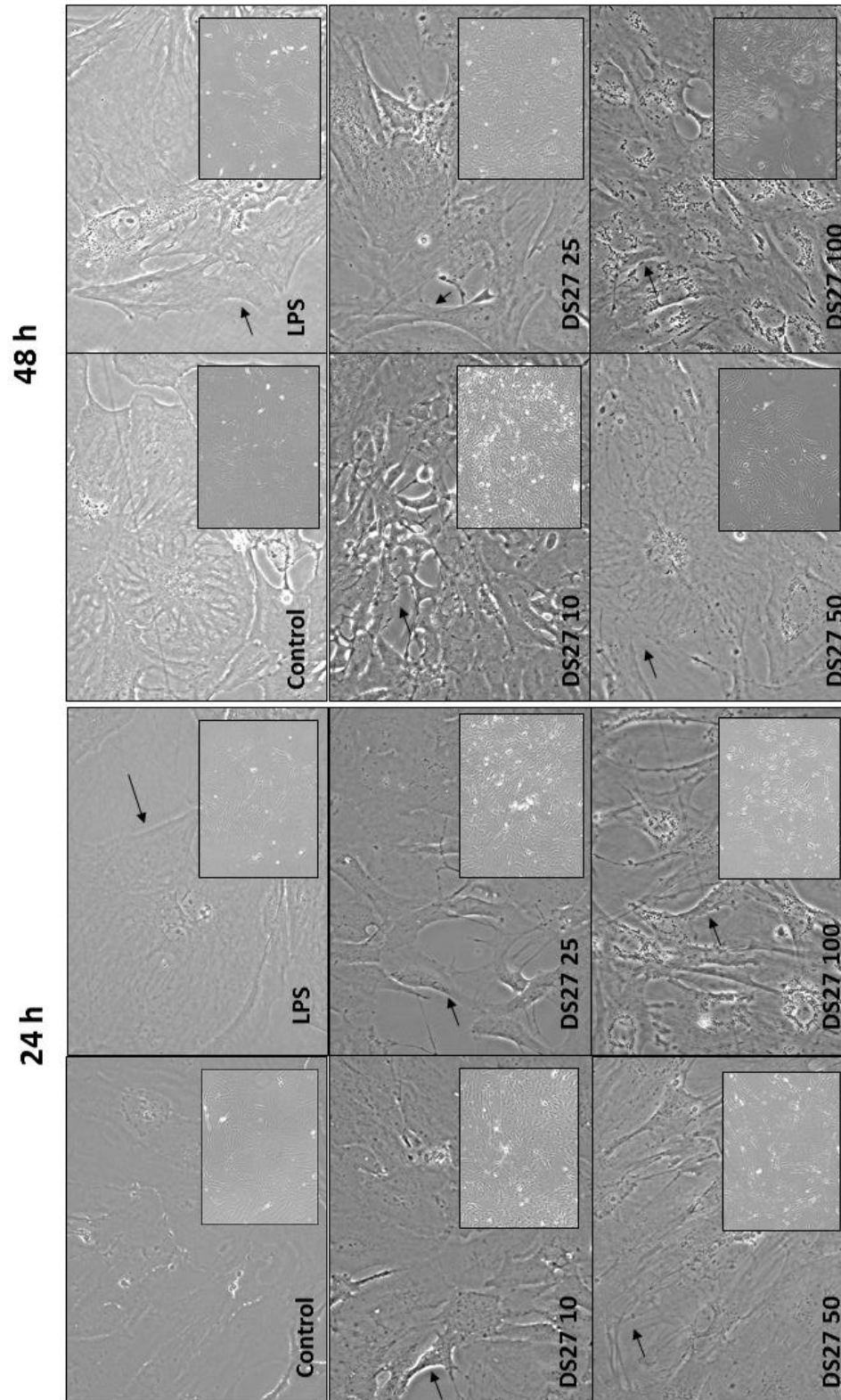
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, et al (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neuroscience* 138:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.039>
- Xu F, Chen L, Zhao X, et al (2017) Interaction of Wip1 and NF- $\kappa$ B regulates neuroinflammatory response in astrocytes. *Inflamm Res* 66:1011–1019. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1085-8>
- Zebisch M, Sträter N (2008) Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6882–6887. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802535105>
- Zimmermann H (2021a) History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochem Pharmacol* 187:114322. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>
- Zimmermann H (2021b) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. *Purinergic Signal* 17:117–125. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09755-6>
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>



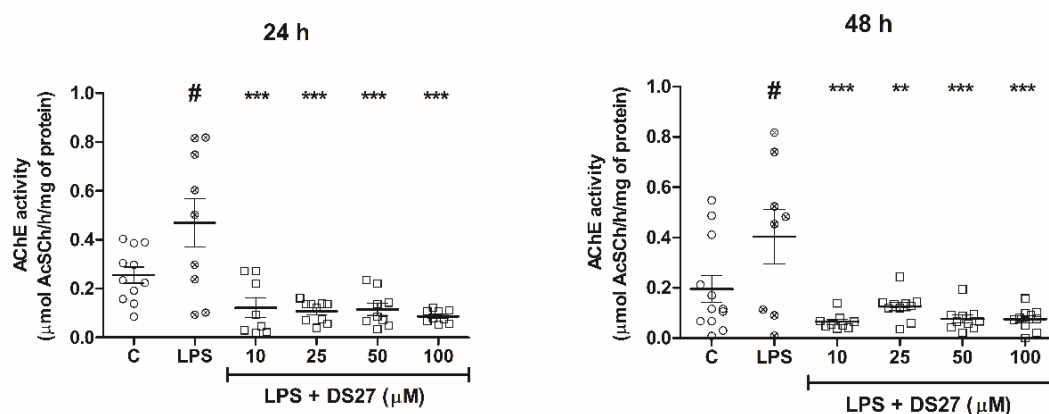
**Figure 1:** Experimental design



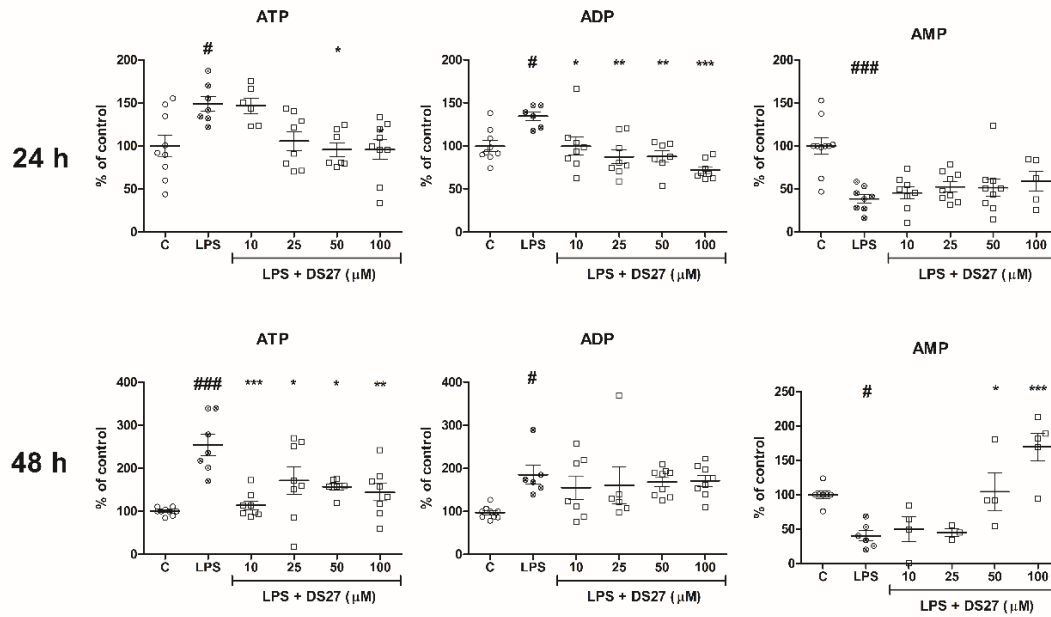
**Figure 2:** Effects of DS27 compound (10-100  $\mu$ M) on cellular proliferation of astrocytes treated with lipopolysaccharide (LPS) after for 24 hours and 48 hours (n=3 independent experiments, each one performed in duplicate or triplicate). #P<0.05 and ###P<0.001, compared to control group, \*P<0.05 and \*\*P<0.01, compared to LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.



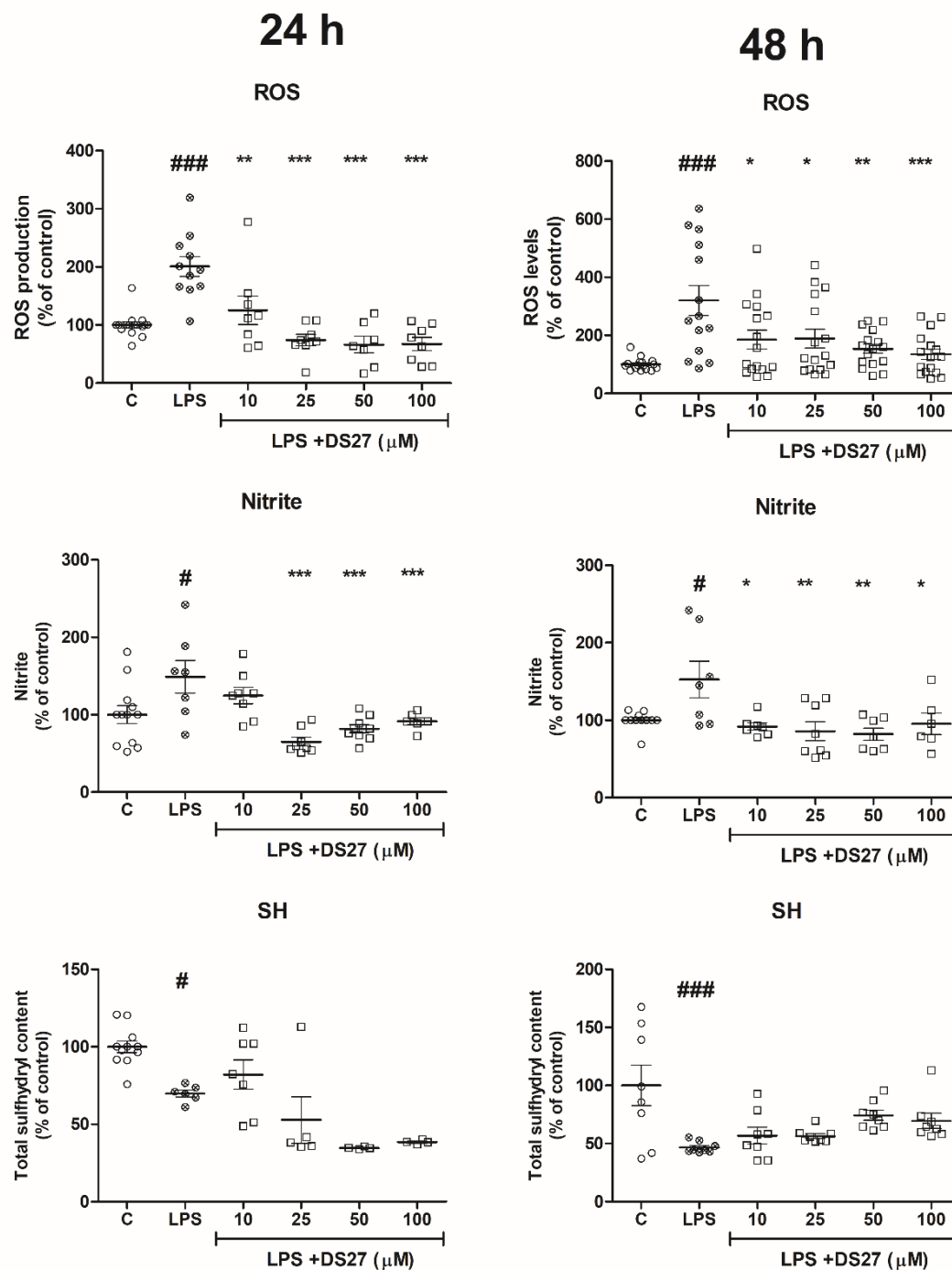
**Figure 3:** Representative phase-contrast microphotographs of astrocytes exposed to LPS and / or DS27 (10-100μM) treatment after 24 and 48 h (images were taken using an Olympus inverted microscope; magnification 20× and 40x). Arrows indicate astrocytes with different morphologies among different treatment groups.



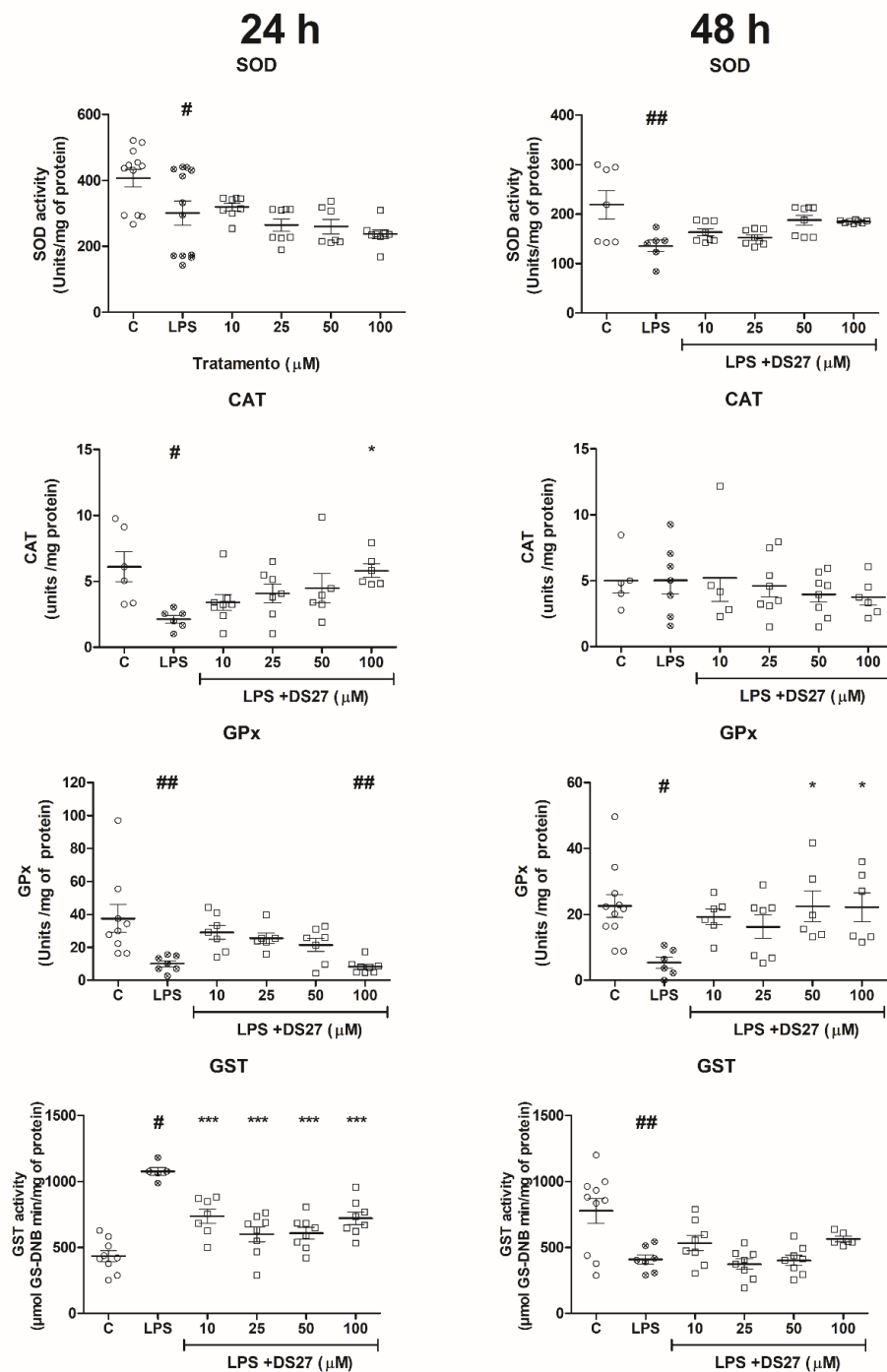
**Figure 4:** Acetylcholinesterase (AChE) activity in primary astrocytic culture exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours. A decrease in AChE activity was observed for all treatment concentrations of DS27 at both times tested (n=3 independent experiments, each one performed duplicate or triplicate). #P<0.05 compared to control group. \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.



**Figure 5:** NTPDase activity using ATP and ADP as substrate and 5'-nucleotidase activity using AMP as substrate in astrocytes exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 compound treatment (10-100  $\mu$ M) after 24 hours and 48 hours. (n=3 independent experiments, each one performed duplicate or triplicate) #P<0.05 and ##P<0.01, compared to the control group, \*P<0.05; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.

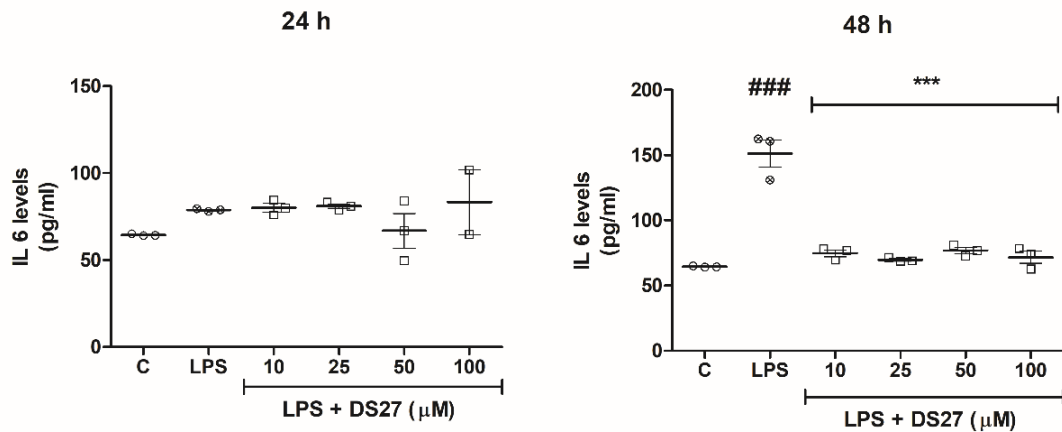


**Figure 6:** Reactive oxygen species (ROS), nitrite levels, and total thiol content (SH) in compound after treatment for 24 hours and 48 hours. (n=3 independent experiments, each one performed duplicate or triplicate). #P<0.05 and ##P<0.01 compared to the control group, \*P<0.05; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 compared to the LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.



**Figure 7:** Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione S-transferase (GST) activities in primary astrocyte cultures exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours (n=3 independent experiments, each one performed duplicate or triplicate). #P<0.05 and ##P<0.01 compared to the control group, \*P<0.05 and \*\*\*P<0.001, compared to the LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.





**Figure 8:** Interleukin 6 (IL-6 levels) in primary astrocyte culture exposed to lipopolysaccharide (LPS) and DS27 (10-100  $\mu$ M) compound after 24 hours and 48 hours. (n= 3 independent experiments). #P<0.05, compared to the control group, \*\*\*P<0.001, compared to the LPS group. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test.

## 5. Discussão

No presente estudo demonstrou-se o potencial efeito glioprotetor do composto DS27 contra alterações morfológicas e bioquímicas induzidas por LPS em cultura primária de astrócitos. Em relação ao tratamento com LPS, nossos resultados corroboram com dados prévios da literatura, que também demonstraram alterações na morfologia e proliferação celular, aumento na atividade da AChE e dano oxidativo em cultura primária de astrócitos de ratos expostas ao LPS (PACHECO *et al.*, 2018). Além disso, é bem documentado na literatura que o LPS também induz a produção de citocinas pró inflamatórias e a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KANG *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2017).

Em relação aos dados de estresse oxidativo observou-se um aumento nos níveis de ROS e nitritos e uma diminuição no conteúdo tiólico total e na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX) em astrócitos expostos ao LPS. Como o LPS não afeta a cadeia transportadora de elétrons (MCNAUGHT; JENNER, 2000), é possível que a produção de ERO tenha se dado por outra via, como a da enzima NADPH oxidase, presente na membrana plasmática do astrócito e mais expressa em astrócitos reativos (BEDARD; KRAUSE, 2007). Entretanto, os resultados de ERO devem ser interpretados com cautela, uma vez que o reagente utilizado, o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>DA), o qual reage com diversas espécies, como NO<sub>2</sub>, •OH, CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>, além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – que indica indiretamente a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pela célula (WRONA; WARDMAN, 2006).

A redução na atividade das enzimas antioxidantes em astrócitos expostos ao LPS pode contribuir para os níveis elevados de ROS observados neste estudo. A ativação do receptor Toll-like 4 por LPS leva a ativação das vias de sinalização nos astrócitos do NF-κB, MAPK e JAK1 /STAT1 que por sua vez diminuiu a expressão da SOD (GORINA *et al.*, 2011). Além disso, também têm sido demonstrado que o LPS é capaz de suprimir a expressão gênica e proteica de GPx e CAT (KIM, C. Y. *et al.*, 2020; KUCUKGUL; ERDOGAN, 2017).

O composto DS27 foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de ROS e nitrito induzidos LPS nos astrócitos nos dois tempos avaliados (24 e 48h). Nossos achados estão de acordo com dados da literatura que também demonstraram que tiazolidin-4-onas têm atividade antioxidante (APOTROSOAEI *et al.*, 2014; BOSENBECKER *et al.*,

2014; ISLOOR *et al.*, 2013) sendo capaz de reduzir a peroxidação lipídica e aumentar o grupo tiol total em sistemas biológicos (BOSENBECKER *et al.*, 2014). Além disso, DA SILVA *et al.* (2021) também demonstraram a capacidade das tiazolidin-4-onas em proteger contra o dano oxidativo cerebral induzido por modelo de déficit de memória em ratos. Considerando que o estresse oxidativo está associado às doenças neurodegenerativas e à neuroinflamação esses achados em relação a redução de espécies reativas oxidativas e nitrosativas pelo DS27 são positivos e promissores.

No entanto, nas análises do conteúdo tiólico total o composto DS27 não foi capaz de prevenir a redução induzida pelo LPS nos astrócitos. Considerando que os astrócitos são importantes produtores de GSH no SNC (DRINGEN; BRANDMANN, 2015), uma possível explicação seria de atividade aumentada de mecanismos celulares, como a glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona-S-transferase (GST), que usem de GSH, oxidando-a a GSSG – logo, reduzindo disponibilidade de grupos tióis durante análise. Entretanto, a medição do conteúdo tiólico por meio do reagente ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), apenas reflete um panorama geral da quantidade disponível de grupos tióis passíveis de oxidação, não discriminando glutathiona de outras proteínas (HAWKINS; DAVIES, 2019). O composto DS27 também não preveniu as alterações na atividade da SOD induzidas por LPS. Entretanto, em 48 h, aparentemente há uma tendência de aumentar, embora os dados não tenham sido estatisticamente significativos. Considerando que essa enzima trabalha, tanto na matriz mitocondrial como no citoplasma, convertendo  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ , é possível que as reduções nos níveis de ROS durante os tratamentos tenham ocorrido pela ação da molécula em outro alvo que não essa enzima.

Em relação a atividade da CAT, percebeu-se um aumento nos astrócitos expostos ao LPS e tratados com de DS27 (100  $\mu$ M) no tempo de 24 h, porém, em 48 h, não houveram diferenças nos níveis dos grupos tratados com DS27 em comparação ao grupo LPS. Considerando que a CAT precisa de um estado redox da GSH adequado, e considerando a possibilidade da redução dos níveis de tióis serem reflexo direto do nível de GSH, isso explicaria a diminuição da atividade dessa enzima (SOKOLOVA *et al.*, 2001). A análise da GPx apresentou diminuição de atividade no tempo de 24 h, em comparação ao LPS, principalmente no grupo exposto a 100  $\mu$ M de DS27, para o qual, surpreendentemente o quadro se inverte no tempo de 48h. Embora os resultados não pareçam ter influência direta da molécula nas suas

concentrações, estranhamente a tendência presente nos gráficos parecem representar o inverso do que se apresenta na CAT.

No ensaio da GST, os resultados obtidos mostram uma redução na atividade enzimática em todas as concentrações utilizadas de DS27 no tempo de 24 h, que não se altera, em relação ao LPS, em 48 h – ao contrário do LPS, que apresenta uma redução na atividade dessa enzima de 24 h para 48 h, em relação ao controle. Entretanto, a aferição da atividade se dá pelo reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), que não discrimina entre as isoformas dessa enzima distribuídas nos compartimentos celulares, apenas permitindo inferir sobre o estado geral da sua atividade enzimática na célula (BURATTI *et al.*, 2021).

A enzima AChE é responsável por hidrolisar rapidamente a acetilcolina em ácido acético e colina. A acetilcolina é um importante neurotransmissor do SNC e uma molécula com ações anti-inflamatórias (GUIZZETTI *et al.*, 1996). Quando astrócitos foram expostos ao LPS ocorreu um aumento na atividade da AChE. Entretanto, o composto DS27 foi capaz de prevenir as alterações na atividade da AChE induzidas por esse protocolo experimental. O DS27 tem uma semelhança estrutural química com a acetilcolina, sendo assim, é esperado que esse composto seja capaz de inibir a atividade da AChE, conforme demonstrado em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (DA SILVA *et al.* 2020). Com bases nestes achados, podemos sugerir que a inibição da atividade da AChE em astrócitos pelo DS27 poderia aumentar os níveis de acetilcolina, uma molécula anti-inflamatória, levando à inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, conforme observado no presente estudo.

Os resultados para a hidrólise de ATP, em 24 h, revelam pouca diferença entre as concentrações de 10 e 25  $\mu$ M com o grupo LPS, havendo apenas uma redução na atividade de hidrólise para as concentrações de 50 e 100  $\mu$ M. Em 48 h, o grupo LPS apresenta aumento da hidrólise de ATP e os grupos expostos à DS27 mostram uma redução na atividade de hidrólise de ATP. Essa lógica se inverte na hidrólise de ADP, onde há diferença nos grupos testados em comparação ao LPS em 24 h, e, em 48 h, a atividade de hidrólise de ADP fica aumentada. Considerando o supracitado, de que astrócitos expressam majoritariamente a NTPDase2 – que preferencialmente hidrolisa ATP, pode-se inferir de que a hidrólise de ADP, por ser realizada por outras NTPDases, ficam limitadas pela concentração de ADP resultante da hidrólise de ATP realizada

pela NTPDase 2. Logo, a DS27 de alguma forma poderia estar regulando a atividade dessa enzima mais de que outras, explicando o aumento da hidrólise de ADP em 48h.

Os resultados da 5-nucleotidase não demonstraram diferenças significativas entre as concentrações do composto DS27 e LPS em 24 h. No entanto, em 48 horas, as concentrações de 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de DS27 aumentaram a atividade desta enzima. No entanto, torna-se necessário mais estudos para avaliar se a atividade aumentada foi devido a algum tipo de modulação, por parte da DS27, sobre a 5'-nucleotidase ou se é um reflexo de alguma outra via reguladora dessa enzima. Uma vez que todos os grupos, exceto o controle, foram expostos ao LPS por 3 h, a redução da atividade de 5'-nucleotidase pode se dar por meio de algum mecanismo de inflamação ativado pelo LPS, possivelmente envolvendo a via da NF- $\kappa$ B. Entretanto este efeito do composto DS27 na NTPDase e 5'-nucleotidase pode modular a sinalização de ATP (uma molécula pró-inflamatória) e iniciar a sinalização de adenosina (uma molécula anti-inflamatória e imunossupressora) contribuindo para diminuir o dano astrocitário induzido por LPS.

Desta forma, considerando que o processo de neuroinflamação é complexo e que envolve várias vias de sinalização, o composto DS27 apresenta um promissor potencial terapêutico uma vez que, conforme demonstrado pelos nossos resultados, ele pode modular diferentes alvos envolvidos na inflamação. Entretanto mais estudos são necessários para elucidar melhor os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor do composto DS27, bem como seus efeitos terapêuticos e parâmetros de toxicidade em modelos in vivo.

## **6. Conclusão**

O composto DS27 apresentou efeito glioprotetor em um modelo de neuroinflamação em cultivo primário de astrócitos expostos ao LPS. Dentre os mecanismos associados a este efeito pode-se citar a ação inibidora da atividade da AChE, diminuição da produção de espécies reativas oxidativas e nitrosativas e redução nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-6.

Além disso, o composto DS27 também foi capaz de modular a atividade de ectonucleotidases em astrócitos expostos ao LPS. Cabe ressaltar que esse é o primeiro estudo demonstrando o potencial de compostos da classe das tiazolidinonas em modular a sinalização purinérgica em astrócitos.

Finalmente, nossos resultados sugerem que o DS27 é um composto multialvo promissor que pode ter efeitos benéficos no tratamento de doenças neurológicas associadas à neuroinflamação.

## 7. Referências

- ABBINK, M. R. *et al.* The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain. **Glia**, [s. l.], v. 67, n. 9, p. 1637–1653, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23625>
- AFIFI, O. S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of purine-pyrazole hybrids incorporating thiazole, thiazolidinone or rhodanine moiety as 15-LOX inhibitors endowed with anticancer and antioxidant potential. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 87, n. January, p. 821–837, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.076>
- ALCEDO, K. P.; BOWSER, J. L.; SNIDER, N. T. The elegant complexity of mammalian ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Trends in Cell Biology**, [s. l.], p. 1–14, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.05.008>
- APOTROSOAEI, M. *et al.* Synthesis, characterization and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-one derivatives. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 213–218, 2014. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741803>
- ASADZADEH MANJILI, F.; YOUSEFI-AHMADIPOUR, A.; KAZEMI ARABABADI, M. The roles played by TLR4 in the pathogenesis of multiple sclerosis; A systematic review article. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 220, n. January, p. 63–70, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.02.004>
- ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1133–1145, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>
- BAIZABAL-CARVALLO, J. F.; ALONSO-JUAREZ, M. The Link between Gut Dysbiosis and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Neuroscience**, [s. l.], v. 432, p. 160–173, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.030>
- BARROS, L. F. *et al.* Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 15–22, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02964-w>
- BATISTA, C. R. A. *et al.* Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 9, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 724–738, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- BEZERRA DE OLIVEIRA FILHO, G. *et al.* Structural design, synthesis and anti-Trypanosoma cruzi profile of the second generation of 4-thiazolidinones chlorine derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 345, n. December 2020, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109514>

- BJØRKLUND, G. *et al.* The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 120, n. September 2020, p. 470–478, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.004>
- BOSENBECKER, J. *et al.* Synthesis and Antioxidant Activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 425–432, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbt.21581>
- BOWMAN, C. C. *et al.* Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. **Glia**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 281–291, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.10256>
- BRENTNALL, M. *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 32, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- BRISEVAC, D. *et al.* Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase1-3 (NTPDase1-3) by cortical astrocytes after exposure to pro-inflammatory factors in vitro. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 871–879, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0088-3>
- BRISEVAC, D. *et al.* Regulation of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in cultured cortical astrocytes by different inflammatory factors. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 681–688, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.017>
- BURATTI, F. M. *et al.* Human variability in glutathione-S-transferase activities, tissue distribution and major polymorphic variants: Meta-analysis and implication for chemical risk assessment. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 337, p. 78–90, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.11.007>
- BURNSTOCK, G. *et al.* Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 229–274, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.006>
- CALLIO, J.; OURY, T. D.; CHU, C. T. Manganese superoxide dismutase protects against 6-hydroxydopamine injury in mouse brains. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 18, p. 18536–18542, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413224200>
- CAMPESE, V. M. *et al.* Regional expression of NO synthase, NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. **Brain Research**, [s. l.], v. 1134, n. 1, p. 27–32, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.067>
- CARLSEN, H. *et al.* Molecular imaging of the transcription factor NF-κB, a primary regulator of stress response. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 551, n. 1–2, p. 199–211, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.02.024>
- CAROFF, M. *et al.* Structural and functional analyses of bacterial



lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 915–926, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01612-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01612-X)

CARTER, S. F. *et al.* Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 77–95, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>

COBLEY, J. N.; FIORELLO, M. L.; BAILEY, D. M. 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. **Redox Biology**, [s. l.], v. 15, n. January, p. 490–503, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>

CRAWFORD, A. *et al.* Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. **Gene**, [s. l.], v. 501, n. 2, p. 89–103, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.011>

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 111–134, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-005-0649-1>

DA SILVA, D. S. *et al.* In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 241–253, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02929-8>

DA SILVA, D. S. *et al.* Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 1554–1566, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03295-0>

DA SILVA, D. S. *et al.* Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 124, p. 574–582, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>

DA SILVEIRA, Elita F. *et al.* Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-ones exhibit selective in vitro antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 266, p. 1–9, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.001>

DA SILVEIRA, Elita Ferreira *et al.* 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 783–797, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00678-4>

DASARI, S. *et al.* Genetic polymorphism of glutathione S-transferases: Relevance to neurological disorders. **Pathophysiology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 285–292, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.06.001>

DI MEO, S. *et al.* Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 1–44, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>

DIENEL, G. A. Brain glucose metabolism: Integration of energetics with function.

**Physiological Reviews**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 949–1045, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00062.2017>

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 139, p. 136–153, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

DRINGEN, R.; BRANDMANN, M. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 40, n. 12, p. 2570–2582, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1481-1>

ELLWARDT, E.; ZIPP, F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 262, n. Part A, p. 8–17, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.02.006>

FERNANDO, V. *et al.* S-nitrosylation: An emerging paradigm of redox signaling. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 9, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox8090404>

FINELLI, M. J. Redox Post-translational Modifications of Protein Thiols in Brain Aging and Neurodegenerative Conditions—Focus on S-Nitrosation. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. September, p. 1–21, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00254>

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2015, p. 1–18, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/610813>

GALASSO, M. *et al.* Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 172, n. March, p. 264–272, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.010>

GEBICKA, L.; DIDIK, J. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 103, n. 10, p. 1375–1379, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.07.011>

GONZÁLEZ-RUIZ, R. *et al.* Mitochondrial manganese superoxide dismutase knock-down increases oxidative stress and caspase-3 activity in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to high temperature, hypoxia, and reoxygenation. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 252, n. September 2020, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110826>

GORINA, R. *et al.* Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 242–255, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.21094>

GRAY, E. *et al.* Increased microglial catalase activity in multiple sclerosis grey matter. **Brain Research**, [s. l.], v. 1559, p. 55–64, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.042>

GRAY, E. *et al.* The PPAR-gamma agonist pioglitazone protects cortical neurons

from inflammatory mediators via improvement in peroxisomal function. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 9, p. 1–12, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-63>

GUIZZETTI, M. *et al.* Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 297, n. 3, p. 265–273, 1996. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00746-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00746-6)

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 51, p. 19683–19708, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>

HEINRICH, T. A. *et al.* Biological nitric oxide signalling: Chemistry and terminology. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 169, n. 7, p. 1417–1429, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.12217>

HERRERO-MENDEZ, A. *et al.* The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 747–752, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb1881>

HOGG, N.; ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B. Detection of Nitric Oxide and Peroxynitrite in Biological Systems: A State-of-the-Art Review. *In*: NITRIC OXIDE. Third Edited. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 23–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804273-1.00003-X>

HUSNA IBRAHIM, N. *et al.* Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Seeking Clarity in a Time of Uncertainty. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. March, p. 1–16, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00261>

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

ILLES, P.; VERKHRATSKY, A. Purinergic neurone-glia signalling in cognitive-related pathologies. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 104, p. 62–75, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.005>

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 73–82, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>

ISLOOR, A. M. *et al.* Synthesis, characterization, anticancer, and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-ones in MCF-7 cells. **Medicinal Chemistry Research**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 758–767, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0071-5>

KANG, J.-B. *et al.* Lipopolysaccharide induces neuroglia activation and NF-κB

activation in cerebral cortex of adult mice. **Laboratory Animal Research**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 1–8, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0018-9>

KAUR MANJAL, S. *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 75, p. 406–423, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>

KIM, C. Y. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Agrimonia pilosa Ledeb. Extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/8571207>

KIM, E. *et al.* Deleterious alteration of glia in the brain of alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 18, p. 1–15, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21186676>

KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 333–343, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>

KUCUKGUL, A.; ERDOGAN, S. Low concentration of oleic acid exacerbates LPS-induced cell death and inflammation in human alveolar epithelial cells. **Experimental Lung Research**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 1–7, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/01902148.2016.1267823>

KUMAR, H. *et al.* The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: Convergence and parallelism. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 10478–10504, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms130810478>

LANGER, D. *et al.* Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 334, n. 2, p. 199–217, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0681-x>

LEITCH, J. M. *et al.* Post-translational modification of Cu/Zn superoxide dismutase under anaerobic conditions. **Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 677–685, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi201353y>

LIDDELOW, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, [s. l.], v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21029>

LINDENAU, J. *et al.* Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. **Glia**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 25–34, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000101\)29:1<25::AID-GLIA3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000101)29:1<25::AID-GLIA3>3.0.CO;2-G)

LINNERBAUER, M.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. **Neuron**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 608–622, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>

LOPEZ-FABUEL, I. *et al.* Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 46, p. 13063–13068, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113>

LU, J.; WU, W. Cholinergic modulation of the immune system – A novel therapeutic target for myocardial inflammation. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v.

93, p. 107391, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107391>

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. **Neuron**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 883–901, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>

MARUCCI, G. *et al.* Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 190, p. 108352, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>

MCNAUGHT, K. S. P.; JENNER, P. Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 979–988, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00415-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00415-9)

MÖLLER, M. N. *et al.* Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 40, p. 14776–14802, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>

MOMTAZMANESH, S.; PERRY, G.; REZAEI, N. Toll-like receptors in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 348, n. August, p. 577362, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577362>

NETEA, M. G. *et al.* Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 135–139, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02169-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02169-X)

NIRWAN, S.; CHAHAL, V.; KAKKAR, R. Thiazolidinones: Synthesis, Reactivity, and Their Biological Applications. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 1239–1253, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/jhet.3514>

O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 353–364, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri2079>

OBERHEIM, N. A. *et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 3276–3287, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>

ODORCYK, F. K. *et al.* Galantamine administration reduces reactive astrogliosis and upregulates the anti-oxidant enzyme catalase in rats submitted to neonatal hypoxia ischemia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 62, n. July, p. 15–24, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.07.006>

OLIVEIRA, Á.; ILLES, P.; ULRICH, H. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 104, p. 272–281, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.008>

PACHECO, S. M. *et al.* Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **Journal of Nutritional**

**Biochemistry**, [s. l.], v. 56, p. 193–204, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>

PASCOTINI, M. E. T. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels are Lower in Chronic Stroke Patients: A Relation with Manganese-dependent Superoxide Dismutase ALA16VAL Single Nucleotide Polymorphism through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Caspases Pathways. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 3020–3029, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.06.032>

PATEL, H. *et al.* Anti-inflammatory effects of astroglial  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors are mediated by inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway and activation of the Nrf2 pathway. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 192, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0967-6>

PAUL-CLARK, M. J. *et al.* Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 200–215, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.05.007>

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1865, n. 8, p. 1949–1967, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.007>

PIRES MENDES, C. *et al.* Synthesis of a novel glibenclamide-pioglitazone hybrid compound and its effects on glucose homeostasis in normal and insulin-resistant rats. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 114, n. January, p. 105–157, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105157>

PUCHALOWICZ, K. *et al.* Purinergic signaling and the functioning of the nervous system cells. **Cellular and Molecular Biology Letters**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 867–918, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1515/cmb-2015-0050>

QIAN, X. hang *et al.* Inflammatory pathways in Alzheimer's disease mediated by gut microbiota. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 68, n. November 2020, p. 101317, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101317>

RADZINSKI, M. *et al.* The cys sense: Thiol redox switches mediate life cycles of cellular proteins. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–28, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11030469>

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, [s. l.], v. 353, n. 6301, p. 777–783, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>

RIZOR, A. *et al.* Astrocytic oxidative/nitrosative stress contributes to parkinson's disease pathogenesis: The dual role of reactive astrocytes. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 8, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox8080265>

ROBB, J. L. *et al.* The metabolic response to inflammation in astrocytes is regulated by nuclear factor-kappa B signaling. **Glia**, [s. l.], v. 68, n. 11, p. 2246–2263, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23835>

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological

significance. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>

RODGERS, K. R. *et al.* Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63766-2>

SAMPATH, V. P. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. **Agriculture and Natural Resources**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 115–120, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.08.002>

SHARMA, G. *et al.* Glutathione peroxidase-1 and neuromodulation: Novel potentials of an old enzyme. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 148, n. December 2020, p. 111945, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111945>

SHEEHAN, D.; MCDONAGH, B. The clinical potential of thiol redox proteomics. **Expert Review of Proteomics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 41–48, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1704260>

SIGALAPALLI, D. K. *et al.* Discovery of certain benzyl/phenethyl thiazolidinone-indole hybrids as potential anti-proliferative agents: Synthesis, molecular modeling and tubulin polymerization inhibition study. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 92, n. June, p. 103188, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103188>

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 3 SPEC. ISS., p. 293–302, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.01.014>

SMITH, G. A. *et al.* Glutathione S-Transferase Regulates Mitochondrial Populations in Axons through Increased Glutathione Oxidation. **Neuron**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 52–65.e6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.017>

SOKOLOVA, T. *et al.* Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: Immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 297, n. 2, p. 129–132, 2001. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01689-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01689-X)

STEPANOVA, A. *et al.* The dependence of brain mitochondria reactive oxygen species production on oxygen level is linear, except when inhibited by antimycin A. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 148, n. 6, p. 731–745, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.14654>

STEPHENIE, S. *et al.* An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 68, n. November 2019, p. 103917, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>

SZYCHOWSKI, K. A. *et al.* 4-Thiazolidinone-Based Derivatives Rosiglitazone and Pioglitazone Affect the Expression of Antioxidant Enzymes in Different Human Cell Lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 139, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111684>

TOZAKI-SAITOH, H.; TSUDA, M.; INOUE, K. Role of Purinergic Receptors in CNS

Function and Neuroprotection. *In*: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (org.). **Advances in Pharmacology**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2011. v. 61, p. 495–528. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00015-1>

TROTSKO, N. Antitubercular properties of thiazolidin-4-ones – A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 215, p. 113266, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113266>

TSIKAS, D.; SURDACKI, A. Biotransformation of organic nitrates by glutathione S-transferases and other enzymes: An appraisal of the pioneering work by William B. Jakoby. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], n. September, p. 113993, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113993>

ULRICH, K.; JAKOB, U. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 140, n. May, p. 14–27, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>

VAKNINE, S.; SOREQ, H. Central and peripheral anti-inflammatory effects of acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 168, n. February, p. 108020, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108020>

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 239–389, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

VICENTE-GUTIERREZ, C. *et al.* Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. **Nature Metabolism**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 201–211, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031-6>

WHITFIELD, C.; WILLIAMS, D. M.; KELLY, S. D. Lipopolysaccharide O-antigens-bacterial glycans made to measure. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 295, n. 31, p. 10593–10609, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.009402>

WINK, M. R. *et al.* Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. **Neuroscience**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 421–432, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.039>

WRONA, M.; WARDMAN, P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 657–667, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.006>

XU, F. *et al.* Interaction of Wip1 and NF- $\kappa$ B regulates neuroinflammatory response in astrocytes. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 1011–1019, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1085-8>

YEGUTKIN, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 473–497, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>

ZARRINMAYEH, H.; TERRITO, P. R. Purinergic Receptors of the Central Nervous System: Biology, PET Ligands, and Their Applications. **Molecular Imaging**, [s. l.], v.



19, p. 1–26, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1177/1536012120927609>

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 19, p. 6882–6887, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0802535105>

ZHANG, Y. *et al.* Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. **Neuron**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 37–53, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>

ZHU, Y.; CARVEY, P. M.; LING, Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Research**, [s. l.], v. 1090, n. 1, p. 35–44, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.063>

ZIMMERMANN, H. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 117–125, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09755-6>

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], n. November, p. 114322, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>

ŽIVKOVIĆ, M. *et al.* The glutathione S-transferase T1 deletion is associated with susceptibility to multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 334, n. 1–2, p. 6–9, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.07.001>

**ANEXOS**

## Anexo A – Carta de Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

15/07/2021

SEI/UFPeL - 0433222 - Parecer



**PARECER Nº**  
**PROCESSO Nº**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
**4/2019/CEEA/REITORIA**  
23110.046528/2018-11

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Potencial anticolinesterásico de heterociclos contendo átomos de nitrogênio e enxofre: estudos in vitro e in vivo**” processo número 23110.046528/2018-11, de responsabilidade de Roselia Maria Spanevello- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

| Finalidade              | ( X ) Pesquisa ( ) Ensino         |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Vigência da autorização | 15/01/2019 a 15/11/2021           |
| Espécie/linhagem/raça   | <i>Rattus norvegicus</i> /Wistar  |
| Nº de animais           | 366                               |
| Idade                   | 20 com 1-3 dias e 336 com 60 dias |
| Sexo                    | Machos                            |
| Origem                  | Biotério Central-UFPeL            |

Código para cadastro **CEEA 46528-2018**

15/07/2021

SEI/UFPEL - 0433222 - Parecer

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix***Presidente da CEEA*

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 12/02/2019, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0433222** e o código CRC **9E2E8B40**.

Referência: Processo nº 23110.046528/2018-11

SEI nº 0433222