

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**Allana Von Sulzback Brasil**

**Efeito do metabólito colônico Urolitina A sobre a toxicidade induzida por  
Microcistina-LR em células da glia**

**Porto Alegre**

**2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**Allana Von Sulzback Brasil**

**Efeito do metabólito colônico Urolitina A sobre a toxicidade induzida por  
Microcistina-LR em células da glia**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Toxicologia de Alimentos.

Orientador (a): Profa Dra Paula Rossini Augusti

Co-orientador (a): Profa Dra Cristiane Casagrande Denardin

**Porto Alegre**

**2022**

## CIP - Catalogação na Publicação

Von Sulzback Brasil, Allana  
Efeito do metabólito colônico Urolitina A sobre a toxicidade induzida por Microcistina-LR em células da glia / Allana Von Sulzback Brasil. -- 2022.  
66 f.  
Orientadora: Paula Rossini Augusti.  
  
Coorientadora: Cristiane Denardin.  
  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2022.  
  
1. Estresse oxidativo. 2. Compostos fenólicos. 3. Catalase. 4. Microcistina-LR. I. Rossini Augusti, Paula, orient. II. Denardin, Cristiane, coorient. III. Título.

***Dedicatória***

*Aos meus pais, Luiz e Mara e aos meus irmãos, Allan e Dyandra.*

*Em memória, Vó Dina.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Mara. A minha vida é uma eterna busca por trazer orgulho e felicidade para todos que me cercam, mas principalmente para vocês. Obrigada pai e mãe, por serem o sopro fresco no dia de calor, fortaleza em meio às tempestades da vida, meu sol nos dias frios e minha força nos dias em que me senti incapaz. Eu amo muito vocês e todas as conquistas são para vocês!

À minha irmã, Dy. Obrigada pelo colo para chorar quando foi necessário, pelas escutas ativas – algumas nem tanto kkk – e por me permitir dividir a vida contigo de forma tão única e especial que é ter uma irmã. Vivemos juntas, uma de cada lado, mas dentro do mesmo apartamento, TCC e dissertação, o choro foi mútuo, mas saímos de mais uma batalha, vitoriosas.

Ao meu tio Flademir, sempre aberto para escutar as angústias e achados da pesquisa. E orgulhoso de partilhar com o mundo as minhas vitórias acadêmicas. Obrigada Tio!

Aos meus amigos, que apesar de vivenciarem a minha ausência em muitos momentos, sempre se mostraram admirados e compreensivos. Em especial, as minhas amigas Gabi e Manu, pois sem o apoio de vocês, seria impossível. Obrigada por me trazerem de volta a vida e sentir que tudo vai ficar bem, com um alento ou com uma mijadinha. Eu vi vocês dentro do meu apartamento de 35m<sup>2</sup> me ajudando a pensar em como executar coisa “x” ou “y”, obrigada por me ajudarem através da ciência, compartilhando conhecimento, ouvindo e me deixando fazer parte da vida de vocês. Amigos são a família que nós escolhemos, amo vocês!

A minha orientadora Paula, pela paciência, por olhar com zelo e por me acalmar quando eu parecia fazer um tsunami em um copo d’água. Pelo conhecimento, por me guiar, por acreditar na minha capacidade e acima de tudo por confiar em mim. Paula, tu foste incansável no processo de me fazer “sair melhor do que entrei”. Obrigada por tanto!

A minha co-orientadora Cristiane, pela receptividade, por abraçar mais um projeto e abrir as portas do seu laboratório frente a uma pandemia. Obrigada pelas conversas e por todo suporte.

Aos colegas do GP BioTox (UFRGS) e toda a equipe do GB ToxBio (Unipampa). Luana, Bruna e Júlia, pelas escalas de repique, as visitas que recebi, obrigada meninas! No grupo do GBToxBio, em especial à Aline, Jean e Nathane, que não mediram esforços para me auxiliar nas análises enquanto estive presente em Uruguaiana e principalmente, quando não podia estar.

A Aline e ao doce, por me receberem como família, pela recepção, por me ajudarem, as madrugadas de prism e por me oferecem suporte. Aline, eu não sei como e nem porque, mas acho que Deus nos mandou em mães separadas nessa vida. Obrigada por tudo!

Um início em meio ao caos, bem diferente do planejado. Uma montanha russa de emoções e mudanças, pessoais -internas e externas- e profissionais. A pandemia me fez aprender que a distância, não seria um impeditivo para que eu realizasse o que era necessário. Mudar dói, mas se você souber de onde está saindo e para onde quer ir, as coisas acontecem. Sou grata à Deus pela oportunidade de mudança, por estar viva e saudável para experienciar isso!

Ao meu big boss, Lucas, obrigada por me auxiliar a enxergar a minha capacidade e resiliência frente as dificuldades. Por ser firme quando eu precisei e me orientar frente as escolhas da vida, sou muito grata! Tubarão nada com tubarão.

A minha equipe, funcionários de suporte, nutris colegas, estagiários... Vocês viveram a emoção da rotina turbulenta comigo, obrigada pela paciência!

Aos professores do PPG, técnicos e demais funcionários que colaboraram com a realização deste trabalho.

As instituições de fomento, que mesmo em um dos piores cenários – político, educacional e social- do país, encontram forças e esgotam recursos – os possíveis- para que a pesquisa continue. E por fim, à UFRGS, Unipampa e ao PPG em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de aperfeiçoamento em curso de tamanha excelência.

“Ensine o que se sabe, pratique o que se ensina e pergunte o que se ignora”.

Mario Sergio Cortella

## RESUMO

Os compostos fenólicos são metabolitos naturalmente presentes em alimentos vegetais, tendo sido relacionados com efeitos benéficos à saúde. Durante a metabolização colônica destes compostos, metabólitos ativos diferentes do composto fenólico original, como a urolitina A (URO-A), podem ser gerados. A URO-A tem ganho atenção em virtude do seu potencial antioxidante. A microcistina-LR (MIC-LR) é uma hepatotoxina cujo mecanismo de intoxicação envolve o estresse oxidativo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial protetor da URO-A contra a neurotoxicidade causada por MIC-LR em células gliais (C6). Células C6 foram incubadas com MIC-LR (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) e/ou URO-A (3, 30, 60 e 100  $\mu\text{M}$ ) por 24h. Após esse período, os tratamentos foram removidos e as células foram lavadas e utilizadas para análises do estresse oxidativo. A MIC-LR, nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ , aumentou a geração de espécies reativas e a morte celular. Além disso, 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR causou inibição da enzima antioxidante catalase. Altas concentrações de URO-A (60 e 100  $\mu\text{M}$ ) causaram inibição na atividade da catalase e apresentaram uma tendência em aumentar a geração de espécies reativas. Em um segundo momento, as células C6 foram pré-tratadas com 3  $\mu\text{M}$  de URO-A por 24 h e então foram expostas a 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR por 24 h. A URO atenuou completamente a geração de espécies reativas, embora nenhum efeito tenha sido observado contra a morte celular e inibição da atividade da catalase causada pela MIC-LR. Os resultados do presente trabalho demonstram que a URO-A pode oferecer efeito protetor contra a toxicidade causada pela MIC-LR ao restaurar os níveis de espécies reativas geradas.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; fermentação colônica; células C6; compostos fenólicos.

## ABSTRACT

Phenolic compounds are metabolites naturally present in plant foods and have been associated with beneficial health effects. During the colonic metabolism of these compounds, active metabolites other than the original phenolic compounds, such as urolithin A, can be generated. Urolithin A has gained attention because of its antioxidant potential. Microcystin-LR is a hepatotoxin whose intoxication mechanism involves oxidative stress. The present work aimed to evaluate the protective potential of urolithin A against the neurotoxicity caused by microcystin-LR in glial cells type C6. C6 cells were incubated with microcystin-LR (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) and/or Urolithin A (3, 30, 60 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 24h. After this period, the treatments were removed, and the cells were washed and used for oxidative stress analyses. microcystin-LR, at concentrations of 1 and 10  $\mu\text{M}$ , increased the generation of reactive species and cell death. In addition, 10  $\mu\text{M}$  of microcystin-LR causing the antioxidant enzyme catalase High concentrations of urolithin A (60 and 100  $\mu\text{M}$ ) caused an increase in catalase activity and showed a tendency to increase reative species generation. In a second moment, C6 cells were pretreated with 3  $\mu\text{M}$  of urolithin A for 24 h and then exposed to 10  $\mu\text{M}$  of microcystin-LR for 24 h. Urolithin A completely attenuated reative especies generation, although no effect was observed against cell death and following catalase activity caused by microcystin-LR. The results of the present work demonstrate that urolithin A may offer a protective effect against the toxicity caused by microcystin-LR by restoring the generated reative species levels.

Keywords: Oxidative stress; colonic fermentation; C6 cells, phenolic compounds.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Integração dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos frente à EROs.....	19
<b>Figura 2.</b> Classificação dos CF da dieta.....	21
<b>Figura 3.</b> Metabolização dos CF pela microbiota intestinal.....	22
<b>Figura 4.</b> Biotransformação do AE em URO.....	23
<b>Figura 5.</b> Imagem microscópica de cultura de células C6 (aumento de 200x) .....	24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estrutura química das principais classes de cianotoxinas.....	15
<b>Tabela 2.</b> Estrutura química das principais classes de microcistinas. ....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Ácido elágico

CAT – Catalase

CF – Compostos fenólicos

DCFH-DA - 2'-7'-dichlorofluoresceína diacetate.

DNA – ácido desoxirribonucleico

EO – Estresse oxidativo

ER – Espécies reativas

EROs - espécies reativas de oxigênio

GPX – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione

GSH – Glutathione

LDH Lactato desidrogenase

MIC – microcistina

MIC-LR – Microcistina – LR

NAC – N-Acetilcisteína

SH – Grupos tiólicos ou sulfídricos

SOD – superóxido dismutase

URO – urolitinas

URO-A – urolitina A

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	14
<b>2.1. Objetivo geral</b>	14
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
<b>3.1 CIANOTOXINAS EM ÁGUAS</b>	15
<b>3.2 MICROCISTINAS</b>	17
<b>3.3. ESTRESSE OXIDATIVO E MIC-LR</b>	19
<b>3.4. COMPOSTOS FENÓLICOS (CF)</b>	22
<b>3.5. CF E MICROBIOTA</b>	22
<b>3.6. Bioatividades da URO-A</b>	24
<b>3.7 Células C6</b>	25
4. APRESENTAÇÃO	26
5. MANUSCRITO	27
<b><i>Urolithin A, a colonic metabolite from ellagic acid, attenuated the neurotoxicity induced for Microcistyn-LR in vitro</i></b>	
5. DISCUSSÃO GERAL	51
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos (CF) são compostos naturais comumente presentes em alimentos vegetais (Zeb 2020). Nessa grande classe dos CF, os elagitaninos (ET) e o ácido elágico (AE) pertencem ao grupo dos taninos e têm sido muito estudados devido à sua ação antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória (Zafrilla et al. 2001).

O AE é encontrado em frutas como morango, framboesa, romã e uva e em oleaginosas como nozes, pistache e castanha de caju. Durante o processo de digestão, o AE é metabolizado por enzimas bacterianas na fase II no intestino grosso, gerando metabolitos chamados Urolitinas (URO) (Anderson et al. 2001; Kang et al. 2016; Murota et al. 2018). O grupo das URO é vasto e pode ser dividido em isorulitinas e urolitinas (URO), que podem ser do tipo A, B, C ou D (García-Villalba et al. 2013). Estes compostos já tiveram bioatividades descritas, entre elas a melhora da função mitocondrial, além do alto potencial anti-inflamatório e antioxidante (Toney et al. 2021).

O estresse oxidativo (EO) pode ser definido como o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas (ER) e a capacidade do metabolismo antioxidante enzimático ou não enzimático de interagirem com essas moléculas. Na impossibilidade de reação por ausência ou supressão da quantidade de enzimas endógenas enzimáticas ou antioxidantes exógenos não enzimáticos, o ambiente se transforma através de sucessivas captura de elétrons de moléculas estáveis por moléculas que estão com um elétron faltante em sua última camada (Sies 2015; Pisoschi and Pop 2015; Murota et al. 2018).

Dentre os eventos associados ao EO, encontra-se a intoxicação por cianotoxinas. As cianotoxinas são geradas por cianobactérias presentes em corpos d'água através de um fenômeno chamado eutrofização. Estas cianotoxinas podem ser classificadas em diferentes grupos como dermatotoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas. As hepatotoxinas mais conhecidas são as do grupo das microcistinas, grupo de toxinas de alto peso molecular e que conta com mais de 200 variantes.

Entre as variantes, a microcistina-LR (MIC-LR) é a mais conhecida devido sua ubiquidade e toxicidade (Wei et al. 2023). Apesar de ser classificada como hepatotóxica, diversos autores têm demonstrado efeitos neurotóxicos. Independente do órgão atingido, o mecanismo dos danos causados pela MIC-LR envolve a

ocorrência de EO (Lichtenberg and Pinchuk 2015). Atualmente, não existem terapias efetivas para as intoxicações por MIC-LR (Lane et al. 2018) e, uma vez que o EO está envolvido nas intoxicações, substâncias com potencial antioxidante, como os CF e seus metabólitos, poderiam ser particularmente eficientes.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da URO-A sobre os danos oxidativos causados por MIC-LR em linhagem de células nervosas (C6).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar, *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações de MIC-LR sobre parâmetros de EO em células C6;
- Avaliar o perfil de segurança de diferentes concentrações de URO A;
- Avaliar o efeito de uma concentração não tóxica de UROA sobre os danos oxidativos causados por uma concentração tóxica de MIC-LR.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 CIANOTOXINAS EM ÁGUAS**

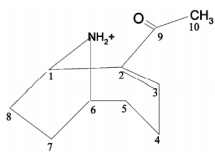
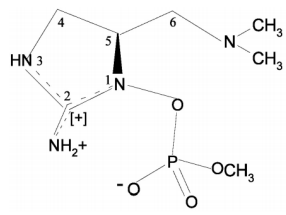
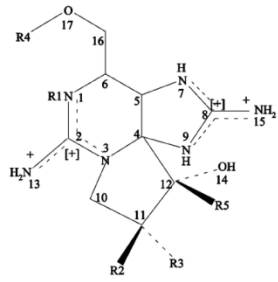
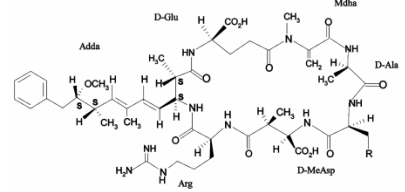
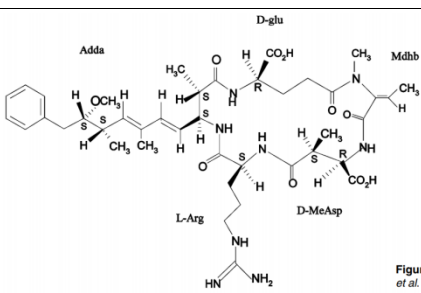
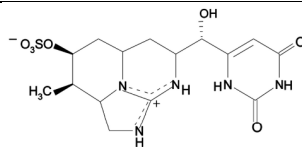
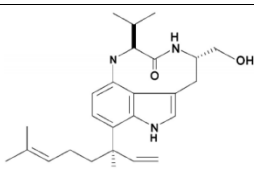
A água é um recurso vital para a saúde, sendo importante não apenas para o consumo humano, mas também para diversas atividades como navegação, pesca, turismo, lazer, termoeletricidade e irrigação (BRASIL 2019). De acordo com dados recentes, 60,5% dos municípios brasileiros tem acesso à rede coletora de esgotos (IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2020). Mesmo com a melhora da oferta de esgotamento sanitário à população, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) identificou que os gastos hospitalares com internações por doenças relacionadas ao saneamento ambiental chegaram a R\$140 milhões de reais no ano de 2011, notificando 396.048 mil internações por diarreia no Sistema único de Saúde (SUS) (Brasil. Fundação Nacional de Saúde. 2013).

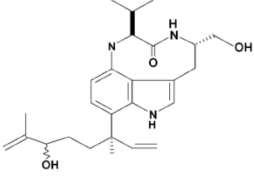
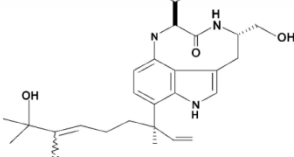
Ao comparar os dados populacionais do ano de 2009 com os dados do ano de 2019 disponibilizados pelo IBGE, é possível verificar um aumento no processo de urbanização de aproximadamente 10% (IBGE 2019), uma vez que o aumento populacional vem acompanhado do aumento das atividades urbanas e industriais (Liu et al. 2017; Luo et al. 2020). Estes fatores combinados têm como resultado um efeito denominado de eutrofização, caracterizado por um aumento da concentração de nutrientes em corpos hídricos, como nitrogênio e fósforo, e crescimento excessivo de microrganismos aquáticos. (Brzezinski 2004; Yang et al. 2008; Gou et al. 2017; Nguyen et al. 2019).

O processo de eutrofização gera uma maior proliferação de microrganismos denominados cianobactérias em mananciais de abastecimento. Tais microrganismos podem gerar além sabor e odor desagradáveis na água de consumo humano, metabólitos secundários potencialmente tóxicos (Nguyen et al. 2019). Estes compostos tóxicos recebem o nome de cianotoxinas e podem ser classificadas em neurotoxinas, hepatotoxinas ou dermatotoxinas, de acordo com o tipo de dano associado à sua presença, conforme identificado na tabela 1.



**Tabela 1.** Estrutura química das principais classes de cianotoxinas.

Classe	Identificação	Estrutura química
Neurotoxinas	Anatoxina	
	Anatoxina-a(s)	
	Saxitoxinas	
Hepatotoxinas	Microcistinas	 Microcystin LR R=CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Microcystin RR R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHC(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH Microcystin YR R=C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -p-OH
	Nodularinas	 Figur et al.
	Cilindrospermopsina	
Dermatotoxinas	Lyngbyatoxina-a	

	Lyngbyatoxina-b	
	Lyngbyatoxina-c	

Fonte: (van Apeldoorn et al. 2007); (BRASIL 2016).

Apesar da existência de grande variedade de cianotoxinas, apenas duas possuem um acompanhamento obrigatório no Brasil. Desta maneira, o Ministério da saúde, através da Portaria 2.914/2011, estabelece a obrigatoriedade na identificação e quantificação de algumas MICs e Saxitoxinas em águas para consumo humano, sendo o valor máximo permitido de 1,0 µg/L para MIC (referente ao somatório de todas as variantes) e de 3 µg/L em equivalentes de STX, respectivamente (Chen and Zhong 2014).

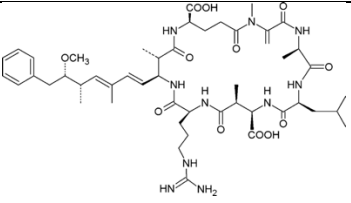
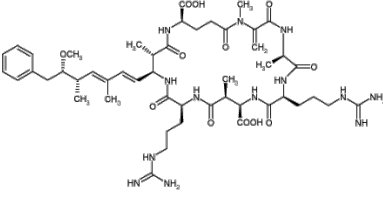
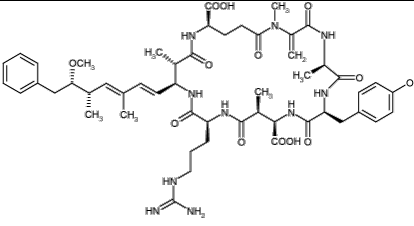
### 3.2 MICROCISTINAS

Dentre todas as cianotoxinas, as mais comumente encontradas são as microcistinas (MIC), hepatotoxinas mais conhecidas e que possuem um mecanismo de hepatotoxicidade aguda já identificado. Através da inibição das fosfatases PP1 e 2A, ocorre uma excessiva fosforilação proteica gerando uma alteração do citoesqueleto, perda de arquitetura celular, lise de hepatócitos, podendo resultar em hemorragia intra-hepática (van Apeldoorn et al. 2007; Liu and Sun 2015).

São conhecidas em torno de 246 variantes de MIC, tendo como característica apenas a modificação da constituição dos seus L-aminoácidos nas porções “2” e “4”, o que modifica a toxicocinética e toxicodinâmica destes compostos (Spoof and Catherine 2017). Entre as MIC, 3 análogos mais tóxicos e com maior frequência de aparição foram identificados: MIC-LR (com os aminoácidos leucina e arginina), MIC-RR (duas argininas) e MIC-YR (aminoácidos tirosina e arginina) (de Figueiredo et al. 2004). Suas diferenças estruturais podem ser observadas na tabela 2.

No Brasil, três grandes episódios de intoxicação humana por MIC foram registrados. Nos meses de março e abril de 1988, houve uma epidemia de casos de diarreia vinculados à ingestão de água contaminada por cianotoxinas, com aproximadamente 2000 casos de gastroenterite e 88 mortes relatadas no município de Paulo Afonso, na Bahia. Em 1996, a água de uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco, foi contaminada por MIC, resultando na intoxicação de 131 pacientes que relataram sintomas de hepatotoxicidade neurotoxicidade, resultando em um total de 76 mortes. Após a análise de soro e amostras de tecido hepático destes pacientes, foram constatadas a presença das variantes LR (MIC-LR), YR (MIC-YR) e AR (MIC-AR) (Carmichael et al. 2001; Azevedo et al. 2002). O último caso de intoxicação por MIC ocorreu em 2001 na cidade do Rio de Janeiro, também envolvendo água de diálise. Neste caso, quatro clínicas de diálise tiveram sua água contaminada com MIC-LR e, dos 44 pacientes em hemodiálise, 90% apresentaram uma alta dosagem sanguínea de MIC-LR (Soares et al. 2006).

**Tabela 2.** Estrutura química das principais classes de microcistinas.

Microcistinas	Estrutura
Microcistina-LR	
Microcistina-RR	
Microcistina-YR	

Fonte: SPOOF; CATHERINE, 2017; VAN APELDOORN *et al.*, 2007.

Apesar da hepatotoxicidade já conhecida da MIC-LR, efeitos neurológicos têm sido observados como dor de cabeça, confusão mental em humanos e processos

neurodegenerativos, com expressão da metaloproteinase-8, relacionada com o rompimento da barreira hematoencefálica em ratos (Wang et al. 2019). Esses efeitos agudos têm sido observados na região do hipocampo e sugerem uma correlação com doenças neurodegenerativas (Peixoto et al. 2016; Qian et al. 2018; Hinojosa, Gutiérrez-Praena, et al. 2019; Zhang et al. 2020). A exposição crônica de camundongos a MIC-LR gerou déficit de aprendizagem, perda de memória e também alterações histopatológicas com dano ao DNA mitocondrial, sendo o hipocampo mais susceptível ao dano do que o córtex cerebral (Zhang et al. 2020).

De modo a elucidar mais os efeitos neurológicos *in vitro* da MIC-LR, Hinojosa *et al.* (2019) testaram diferentes concentrações de MIC-LR e de outra cianotoxina chamada Cilindrospermopsina em células SH-SY5Y e observaram a alteração dos níveis de glutatona (GSH) e um aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase combinado a alterações morfológicas, gerando ao fim um processo apoptótico.

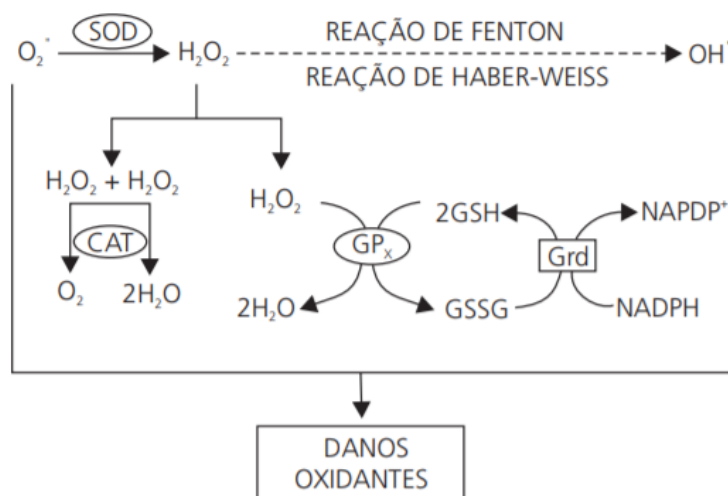
Por sua vez, em mecanismos *in vivo*, expondo ratos ou camundongos à MIC-LR foi possível observar comprometimento cognitivo, aumento dos níveis de malonaldeído e atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase em filhotes de ratos expostos a MIC-LR (X. Li et al. 2015). Outro grupo verificou que a exposição crônica a MIC-LR, além de ultrapassar a barreira hematoencefálica, pode gerar efeitos similares a doença de Parkinson. Nesse estudo, a MIC-LR causou o aumento de células gliais, liberação de fatores inflamatórios como as interleucinas e ainda induziu perda e/ou dano em neurônios dopaminérgicos e conseqüentemente nas enzimas, proteínas e transportadores envolvidos no processo dopaminérgico (Yan et al. 2022).

### **3.3. ESTRESSE OXIDATIVO E MIC-LR**

O EO é o desequilíbrio do estado redox da célula e acontece devido a um aumento na produção de ER ou a uma redução na ação dos sistemas antioxidantes, o que gera ao fim um desequilíbrio entre geração ER e a efetividade das defesas antioxidantes (Lichtenberg and Pinchuk 2015; Pisoschi and Pop 2015). A geração de ER é um mecanismo fisiológico e contínuo e comumente ocorre nas mitocôndrias, citoplasma e membranas celulares. São ER: radical hidroxil (OH·), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical peroxil (ROO·), radical alcóxil (RO·), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e óxido nítrico (NO·). O acúmulo

de  $\text{H}_2\text{O}_2$  possibilita, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), única ER de oxigênio (ERO) que não possui uma defesa enzimática eficiente para realização de sua catalise (Figura 1). Estas ER possuem a capacidade de interagir com diferentes organelas celulares, o que pode gerar dano a proteínas, lipídios, e até mesmo, ao DNA (Sies 2015; Lichtenberg and Pinchuk 2015). As ER podem ser removidas por sistemas de enzimas antioxidantes como a glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (ambas removem  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), além da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Barbosa et al. 2010).

**Figura 1.** Integração dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos frente a EROs. SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutaciona peroxidase; Grd: Glutaciona redutase; GSH: Glutaciona.



Fonte: (Vincent et al. 2007; Barbosa et al. 2010).

O envolvimento do EO nas intoxicações por MIC-LR ocorre através do aumento significativo da geração de ER e/ou redução na atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD (Wang et al. 2014; Tönnies and Trushina 2017; Qian et al. 2018; Zhang et al. 2020). Outros autores também indicaram que a MIC-LR pode realizar a redução da expressão da enzima CAT, e através da destruição das defesas antioxidantes, estimular de forma direta a geração de ER *in vivo* (Liu et al. 2018; Zhong et al. 2020; Wei et al. 2023). Em acordo com essa informação, um aumento na expressão das

enzimas CAT e SOD em *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) expostos a altas concentrações de MIC-LR foi observado (P.R. Augusti et al. 2017).

Atualmente, não existem muitos tratamentos efetivos contra a intoxicação por MIC-LR, tornando-se de extrema importância encontrar alternativas que possam auxiliar na prevenção e/ou terapêutica das intoxicações (Paula Rossini Augusti et al. 2017; Abdel-Daim et al. 2019; Al-Hazmi 2020). Uma vez que o EO está envolvido na toxicidade da MIC-LR, a utilização de antioxidantes na terapêutica de intoxicações tem se mostrado efetiva (Chen and Zhong 2014; Wang et al. 2014).

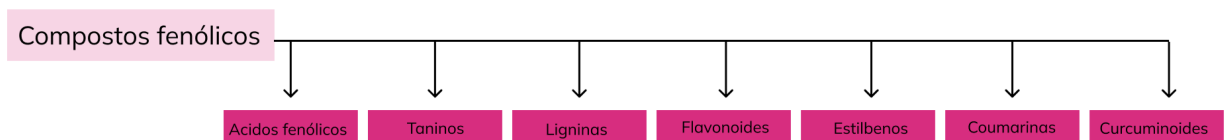
Ishfaq *et al* (2022) demonstraram o efeito do extrato aquoso de cogumelos Chaga (*Inonotus obliquus*) em atenuar os danos a GSH e CAT causados por MIC-LR em camundongos (Ishfaq et al. 2022). Foi também observado que o promissor antioxidante LASSBio-596 conseguiu reduzir os danos oxidativos causados por MIC-LR nos pulmões e fígados de ratos (Casquilho et al. 2018). A N-Acetilcisteína (NAC) foi capaz de reduzir os níveis de 8-OHdG e a carbonilação de proteínas causada pela MIC-LR em camundongos. Adicionalmente, a NAC foi capaz de melhorar a resposta antioxidante total, além da atividade das enzimas antioxidantes em testículos de peixe zebra (Zhao et al. 2018; Lad et al. 2022). A silimarina e o alho demonstraram um potencial uso na terapêutica de intoxicações por MIC-LR ao restaurar a geração de EROs e outros parâmetros em tecidos como coração, pulmões e fígado de camundongos (Al-Hazmi 2020; Ait Abderrahim et al. 2021).

Apesar dos estudos existentes, poucos estudos demonstram efeito de antioxidantes em modelos de neurotoxicidade causada por MIC-LR. Em acordo com essa informação, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o carotenoide luteína protegeu larvas de *C. elegans* contra a neurotoxicidade causada pela MIC-LR (P.R. Augusti et al. 2017). Outros grupos também expuseram achados como a utilização de piperina como pré-tratamento a exposição e intoxicação de MIC-LR em ratos, mostrando um potencial efeito antioxidante atenuando o efeito gerado pela toxina no fígado e no cérebro. (Abdel-Daim et al. 2019). Germoush et al (2022) também relataram a capacidade da *Spirulina platensis* em reduzir o dano oxidativo gerado pela MIC-LR em tecido cerebral de ratos, além de outros tecidos como tecidos renais, hepáticos e cardíacos.

### 3.4. COMPOSTOS FENÓLICOS (CF)

CF são produtos do metabolismo secundário de vegetais, sendo responsáveis por importantes funções como proteção contra herbívoros, radiação UV e infecções microbianas bem como atração de polinizadores (Augusti et al. 2021). Os CF possuem ao menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxil ligados a ele e, de acordo com a estrutura química, podem ser classificados como ácidos fenólicos, taninos, lignanas, flavonoides, cumarinas e curcuminoides (Figura 2). Estes compostos têm sido estudados por seus efeitos benéficos à saúde, tais como efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico e antiproliferativo (Stasiuk and Kozubek 2010; Singh et al. 2020; Toney et al. 2021). Adicionalmente, estudos sugerem que ingestões baixas de CF ao longo do tempo podem ser benéficas para a prevenção de doenças crônicas (Stasiuk and Kozubek 2010; Sies 2015).

**Figura 2.** Classificação dos CF da dieta.



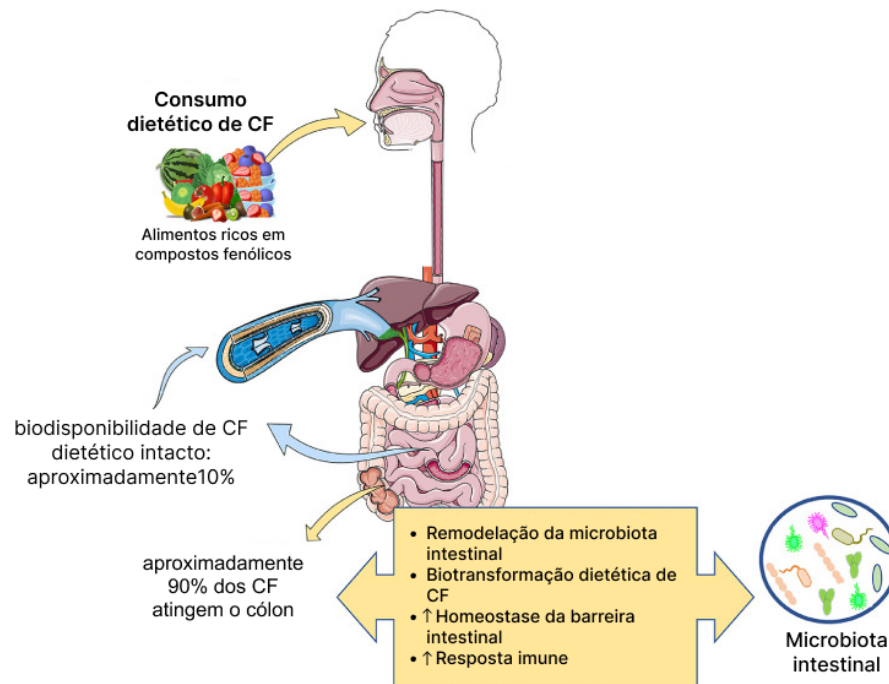
Fonte: adaptado de Liu. 2004; Levi et al., 2020.

### 3.5. CF E MICROBIOTA

Cerca de 90% dos CF da dieta não é absorvido no intestino delgado, alcançando o cólon (KAWABATA; YOSHIOKA; TERAU, 2019, onde é extensamente metabolizado pela microbiota local a produtos menores, que normalmente possuem melhor absorção que os CF originais (Figura 3). Muitos destes metabólitos possuem bioatividades e são responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos associados aos CF (AUGUSTI et al., 2021). Por outro lado, os CF podem agir como prebióticos ao modular a microbiota colônica e tal efeito tem sido associado a efeitos benéficos dos

CF, como regulação da homeostase intestinal e resposta imune. Desta maneira, a interação dos CF com a microbiota é uma via de mão dupla, onde a microbiota influencia a metabolização dos CF até produtos fenólicos bioativos e os CF estimulam a proliferação de bactérias benéficas ao intestino (Figura 3) (AUGUSTI ET AL., 2021).

**Figura 3.** Metabolização dos CF pela microbiota intestinal.



Fonte: adaptado de Augusti *et al.*, 2021.

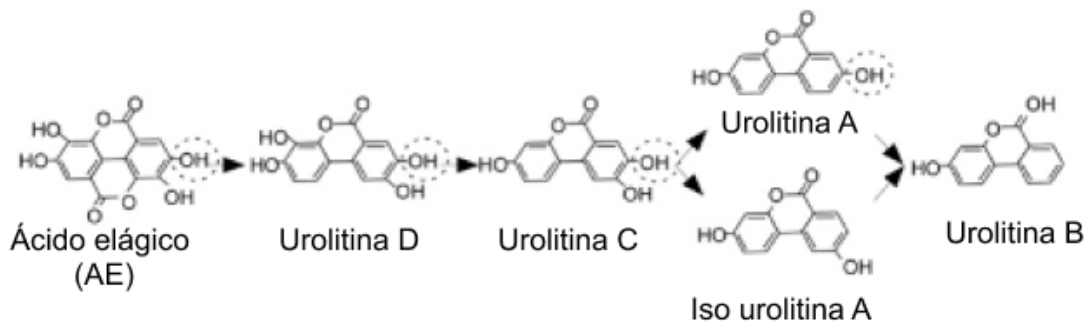
O AE (Figura 2) é um composto natural encontrado em frutas como romã, morango, diferentes tipos de framboesa, uvas, assim como em diferentes oleaginosas como nozes e castanhas do Pará. Durante o processo digestivo, a fração de AE não absorvida no intestino delgado atinge o cólon e entra em contato com a microbiota residente (MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2015; ZHANG *et al.*, 2022).

A biotransformação do AE ou dos elagitaninos pela microbiota gera um grupo de metabolitos chamado de urolitinas (URO) (Figura 3). O grupo das URO compreende URO A, B, C e D e a iso urolitina A (Anderson *et al.* 2001; García-Villalba *et al.* 2013; Kang *et al.* 2016). Desta maneira, as URO surgem como novos compostos bioativos naturais e seus efeitos moduladores do estresse oxidativo, anti-inflamatório, antiproliferativo e anti-idade já foram descritos (Ishimoto *et al.* 2011; Djedjibegovic *et al.* 2020; D'Amico *et al.* 2021; Toney *et al.* 2021; Kikuchi *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2022).



Dentre todas as descritas, as URO A e B são as mais prevalentes e URO A vem sendo mais frequentemente estudada pela presença de dois anéis aromáticos junto de dois grupos hidroxil, que elevam o seu potencial antioxidante (Djedjibegovic et al. 2020; Bobowska et al. 2021).

**Figura 4.** Biotransformação do AE em URO.



Fonte: Extraído de KANG *et al.*, 2016.

### 3.6. Bioatividades da URO-A

Artigos recentes descrevem que a URO-A possui igual ou maior potencial de proteção contra injúrias ao sistema nervoso do que o AE. Tanto o AE derivado de framboesa quanto a URO-A apresentaram efeitos anti-inflamatórios em células da micróglia. Entretanto, apenas a URO-A foi capaz de suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios ativados por lipopolissacarídeo (Toney et al. 2020). Adicionalmente, a URO-A protegeu neurônios dopaminérgicos em modelo celular de doença de Parkinson ao promover biogênese mitocondrial (Liu et al. 2022). Ainda foi observado que as URO A e B, bem como o AE, realizam a inibição do acúmulo de lipídios e do fator de necrose tumoral em adipócitos (Cisneros-Zevallos et al. 2020).

Tendo em vista que a URO-A é um metabólito com importantes bioatividades, este composto poderia ser utilizado para prevenir ou tratar danos oxidativos ligados ao sistema nervoso. De acordo, URO-A protegeu neurônios da morte e inflamação em modelo animal de doença de Alzheimer, bem como protegeu contra a injúria isquêmica neuronal por mecanismos de autofagia ligados a supressão do EO (Chen et al. 2019; Cásedas et al. 2020; Gupta et al. 2021). Outros autores corroboram com a literatura através de trabalhos utilizando a URO-A isolada ou associada a algum

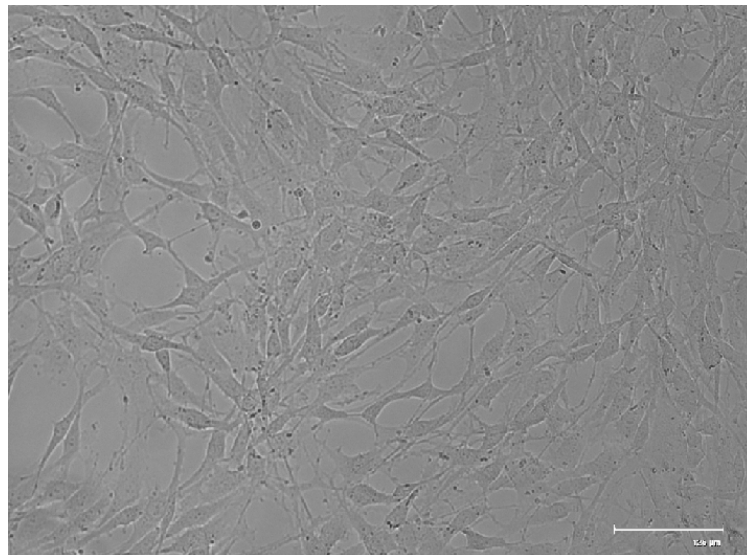
outro composto visando benefícios atrelados ao sistema nervoso central para o tratamento de intoxicações ou patologias (Fang et al. 2019; Kshirsagar et al. 2022)

Apesar dos estudos mostrando efeitos de CF vegetais contra a toxicidade da MIC-LR e os estudos acerca do potencial neuroprotetor da URO-A descritos acima, não foram encontrados até o momento estudos avaliando o papel protetor da URO-A sobre os danos oxidativos causados pela MIC-LR em células gliais.

### 3.7 Células C6

As células gliais do tipo C6 tem sido amplamente utilizada em pesquisa pela similaridade à astrocitos, com um formato estrelado alongado (Figura 5), as células que fazem a comunicação do sistema endotelial com as células neuronais. Tendo em vista que estas células têm alta correlação com a fixação de memória e manutenção da saúde do sistema nervoso central, se faz necessária a busca de novas substâncias neuroprotetoras (Izdebska et al. 2018; Galland et al. 2019).

**Figura 5.** Imagem microscópica de cultura de células C6 (aumento de 200x).



**Fonte:** a autora.

#### **4. APRESENTAÇÃO**

A metodologia utilizada, bem como os resultados obtidos no presente trabalho, encontra-se no manuscrito intitulado “Urolithin A, a colonic metabolite from ellagic acid, attenuated the neurotoxicity induced for Microcystyn-LR *in vitro*”. O presente manuscrito foi submetido ao periódico Food and Additives Contaminants – Part A.

## 5. MANUSCRITO

### **Effect of Urolithin A, a colonic metabolite from ellagic acid, against oxidative damage induced for Microcistyn-LR in C6 cells**

Allana Von Sulzback Brasil<sup>a</sup>, Aline Castro Caurio<sup>b</sup>, Jean Ramos Boldori<sup>b</sup>, Cristiane Casagrande Denardin<sup>b</sup> and Paula Rossini Augusti<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;*

<sup>b</sup> *Campus Uruguaiana, Federal University of Pampa (Unipmpa), Uruguaiana, Brazil.*

\*Author to whom correspondence should be addressed.

E-mail: [paula.augusti@ufrgs.br](mailto:paula.augusti@ufrgs.br); Phone: +55-51-3308-6676

## Abstract

Microcystin-LR (MIC-LR) is a toxin whose mechanism of intoxication involves oxidative stress. URO-A is a metabolite from colonic fermentation of ellagic acid with antioxidant potential. This study aimed to evaluate the putative protective effect of URO-A against MIC-LR toxicity in C6 cells. C6 cells were incubated with MIC-LR (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) and/or URO-A (3, 30, 60 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. After the incubation time, treatments were removed and cells were submitted to analysis of oxidative stress parameters. MIC-LR 1 and 10  $\mu\text{M}$  induced reactive species (RS) generation, depletion in total thiol (SH) groups and survival loss when compared with control group. Also, at 10  $\mu\text{M}$ , MIC-LR induced CAT activity inhibition. URO-A at concentrations of 60 and 100  $\mu\text{M}$  caused CAT activity inhibition and showed a trend to increase RS generation. In a second moment, C6 cells were pre-treated with 3  $\mu\text{M}$  URO-A for 24 h and then exposed to 10  $\mu\text{M}$  MIC-LR for 24 hours. URO at 3  $\mu\text{M}$  completely attenuated the RS generation and the impairment in SH groups caused by MIC-LR. However, no effect of URO-A was observed on survival loss and CAT activity inhibition induced by 10  $\mu\text{M}$  MIC-LR. Our results demonstrated that URO-A might offer protective effect against toxicity caused by MIC-LR in glial cells by restoring the levels of RS and SH groups.

Keywords: oxidative stress, phenolic compounds, catalase, survival loss.

## Introduction

The proliferation of cyanobacteria in water bodies has been a big problem of health public, mainly by the production of cyanotoxins. The most prevalent and studied group of cyanotoxins is the hepatotoxin microcystins (MICs), and the most important variant is the microcystin-LR (MIC-LR) (Gou et al. 2017; Melaram et al. 2022). The intoxication for MIC-LR can take place by consumption of contaminated water and foods, dermal contact and aerosol inhalation (Carmichael et al. 2001; Li et al. 2015; Zhang et al. 2020). MIC-LR is known to cause primary damage to liver and water contaminated with MIC-LR has been associated with the risk for primary liver cancer (Carmichael et al. 2001; Azevedo et al. 2002; Soares et al. 2006; Chen et al. 2009; Svirčev et al. 2014; Zhang et al. 2020; Arman and Clarke 2021).

Besides hepatotoxicity, recent studies have demonstrated that neurotoxic effects are also important in MIC-LR intoxications. MIC-LRs can cross blood-brain barrier (BBB) with the transport by OATPs carriers, causing neurostructural, functional, and behavioural changes (Hu et al. 2016). Accordingly, in an accident occurring with dialysis Brazilian patients, individuals presented hepatic damage along with loss of vision, dizziness, and headaches (Carmichael et al. 2001; Azevedo et al. 2002; Soares et al. 2006; Augusti et al. 2017).

Among the mechanisms for MIC-LR toxicity, the oxidative stress (OS) is characterized for an imbalance of production and removal of reactive species (RS), potentially leading to damage in lipids, proteins and DNA. MIC-LR has shown to induce RS generation, lipid peroxidation and glutathione (GSH) depletion in intestine, liver, and kidney in *in vitro* and *in vivo* studies (Arman and Clarke 2021). In a recent study from our group, environmentally relevant concentrations of MIC-LR were able to cause

death along with RS generation and antioxidant enzymes impairment in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), a known model for neurobiology evaluations (Augusti et al. 2017).

In view of the lack of therapy for MIC-LR intoxication and the involvement of OS in its toxicity mechanism, the use of antioxidants as adjunct agents in MIC-LR toxicity prevention or therapeutics may be an alternative. In fact, some compounds, including antioxidants, have been described as potential chemoprotectants against the toxic effects of cyanotoxins (Guzmán-Guillén et al. 2017). Accordingly, our group demonstrated that the carotenoid lutein was able to protect *C.elegans* from oxidative damage induced by MIC-LR (Augusti et al. 2017).

Phenolic compounds (PC) are secondary plant metabolites and have been widely studied because of their effects in human health, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, anticarcinogenic and also antibacterial and fungicidal (Stasiuk and Kozubek 2010; Yuan et al. 2019; Zeb 2020; Fernández-Ochoa et al. 2022). Among PC, the ellagic acid (EA) is obtained from ellagitannins (ET) hydrolysis, being present in many nuts, seeds and fruits. The EA chemical structure has aromatic rings that have a strong connection with its bioactivities, including antioxidant (Yamada et al. 2018; Aguilar-Zarate et al. 2018).

*In vivo* metabolization of ET occurs in liver, where the ET are metabolized for phase I and phase II enzymes through reactions of hydroxylation, sulphation, methylation and glucuronidation. The ET are converted to EA in the process and the non-absorbable fraction of EA are metabolized by the gut microbiota intestinal where the lactone ring is cleaved and decarboxylated for the most dehydroxylation reactions (Madeira Junior et al. 2015; Djedjibegovic et al. 2020; Gupta et al. 2021). One product



of these microbiota transformations of EA is called urolithins (URO), a class of metabolites more bioavailable than EA. Thus, it is possible that bioactivities associated to the consumption of EA be actual a result from this group of metabolites. In fact, many authors demonstrate the neuroprotective, immunomodulatory, anti-obesity and anti-inflammatory potential of URO (Djedjibegovic et al. 2020; Toney et al. 2021; Kikuchi et al. 2021; D'Amico et al. 2021; Gupta et al. 2021; Zhang et al. 2022).

URO-A is the predominant isoform of URO found in the plasma and urine following the consumption of ET and EA (Tomás-Barberán et al. 2017). The antioxidant activity of URO-A has been gaining prominence, since this compound was able to scavenge ROS, inhibit oxidant enzymes such as monoamine oxidase A and tyrosinase, (Djedjibegovic et al. 2020), besides to reduce lipid peroxidation and increase the activity of antioxidant enzymes in cells (Ishimoto et al. 2011; Chen et al. 2019; Cásedas et al. 2020; Djedjibegovic et al. 2020). Moreover, URO-A can cross BBB and is present in the plasma and brain of rats consuming pomegranate juice, contributing to its neuroprotection against PD (Kujawska et al. 2019).

Despite the studies showing effect of antioxidants against MIC-LR toxicity, none study evaluating the role of PC colonic metabolites, such as URO-A, against neurotoxicity of MIC-LR was found until the present moment. The aim of the present study is to corroborate the neurotoxicity of MIC-LR in glial cells and to evaluate the putative protective effect of URO-A against this neurotoxicity.

## **Materials and Methods**

### *Urolithin A and Microcystin-LR*

MIC-LR powder (C49H74N10O12) was obtained from Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA). URO-A (3,8-Dihydroxy-6H-benzo[c]chromen-6-one) was obtained from Sigma–Aldrich (St. 118 Louis, MO). Both URO-A and MIC-LR were solubilized with DMSO so that the final concentration of DMSO in the cells was not greater than 0.1%.

### *Cell culture and treatments*

Glioma cell line (C6) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, RJ, Brazil) and cultured in DMEM medium (Sigma, USA) enriched with 10% fetal bovine serum glucose (400 mg%) and kept at 37°C in a humidified environment at 95% with 5% CO<sub>2</sub> (LIUBICH et al., 2017). Cells with passage between 12 and 65 and minimum confluence of 70% were used. Firstly, C6 cells were separately treated with MIC-LR (1 and 10 µM) and URO-A (0, 3, 30, 60 and 100 µM) during 24h. Afterwards, oxidative damage markers (survival rate, RS generation and antioxidant defences) were evaluated. In a second moment, C6 cells were pre-treated with URO-A at 3 µM for 24 h before being exposed to 10 µM MIC-LR. After 24h of MIC-LR exposure, treatment was removed, and cells were used in the oxidative damage analyses.

### *Cell viability*

An MTT assay was carried out to quantify metabolically viable cells. This is a colorimetric assay where the soluble yellow tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, Inc., Saint Louis, MO, USA) is reduced to insoluble blue-purple formazan crystals by the mitochondrial

succinate dehydrogenase enzyme activity (Stockert et al. 2012). Thus, not viable cells present less blue-purple coloration. After incubation times, cells were washed with PBS and incubated with 1 mg/mL MTT for 2 h at 37°C with injection of CO<sub>2</sub>. After this incubation time, purple crystals were dissolved in DMSO and the absorbance was measured using a spectrophotometric microplate reader (Spectra Max M5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 630 nm and 570nm (final absorbance = A570-A630).

### *RS generation*

The intracellular RS generation were estimated using 2',7'-dichloro- fluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) as a fluorescent probe, as described before (Wang and Joseph 1999). This probe penetrates cells where it is then deacetylated by cellular esterases to a non-fluorescent compound, which is later oxidized by RS into the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Thus, the greater intracellular generation of RS, the greater is DCF fluorescence. The cells were incubating with 100µM of H<sub>2</sub>DCFDA for 1 hour at 37 °C before treatments with MIC-LR and/or URO-A. After the incubation time, cells were then detached by trypsinization, washed twice with PBS, and treated with 150 µM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). RS generation was measured by DCF fluorescence using a fluorescence reader (M5 – Molecular Devices) with 530nm emission and 485nm of excitation at 37°C. Results were presented as DCF fluorescence intensity (RFU).

### *Total thiol groups (SH)*

The thiol groups was evaluated at 412 nm after the reaction of samples with 10 mM 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), as described by Ellman (1959) modified by Maldonado (2006) (Ellman 1959; Maldonado et al. 2006).

#### *Catalase (CAT) activity*

The activity of CAT was evaluated by the method previously described by Aebi (1984), based on the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240nm. The activity was specified in units of CAT/mg of protein, where a CAT unit corresponds to 1 mole of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute. Protein content was maintained by the Petterson method (Lowry modified for plaque) (Aebi 1984).

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism 8 for MacOS (Graphpad software, version 6.0, San Diego, USA). Data were reported as mean +/- SEM and the results were analysed by one-way ANOVA followed Tukey's test when necessary. Differences were considered significant when  $p < 0,05$ .

## **Results and discussion**

In the present study, we aimed to corroborate the neurotoxicity caused by MIC-LR. In agreement, C6 cells treated with 1 and 10  $\mu$ M MIC-LR presented increased RS generation along with survival loss when compared with the control group (absence of MIC-LR) ( $p < 0.05$ , Figure 1A and 1B). This corroborates a previous report about

neurotoxicity of MIC-LR (Augusti et al. 2017), where MIC-LR caused oxidative damage in *C. elegans*, an organism without liver and a known model for neurotoxicity evaluation. Moreover, the OATP1A2 (hepatic transporter of MIC-LR) is also expressed in blood–brain barrier in humans (Fischer et al. 2005). This means that significant amounts of MIC-LR could reach the brain across the blood–brain barrier and induce brain pathology (Hinojosa et al. 2019). Our results also showed that 1 and 10  $\mu\text{M}$  MIC-LR decreased the concentration of total -SH groups in glia cells ( $p < 0.05$ , figure 1C). This marker represents the oxidative status of proteins as changes in the redox state of thiol/disulfide couples could affect the structure and function of almost all proteins, including oxidation-reduction enzymes. In fact, oxidative modification of proteins is a common oxidative damage caused by MICs in tissues of many aquatic organisms (Amado and Monserrat 2010).

When checking the enzymatic antioxidant system, only the highest concentration of MIC-LR (10  $\mu\text{M}$ ) caused a reduction in CAT activity when compared with control ( $p < 0.05$ , figure 1D). CAT catalyses the breakdown of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which is highly reactive and can cause cell damage. The reduction in antioxidant enzyme activity leads to the increase in RS levels, which reacts with membrane-associated lipids causing oxidative damage in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* (Liang et al. 2017). Thus, we can not rule out that the decrease in SH groups induced by MIC-LR impaired the catalytic activity of CAT and that its inhibition contributed to RS generation and viability loss of C6 cells.

Glia cells are non-neuronal cells that support and protect neurons. Among them, astrocytes are homeostatic cells that play a crucial role in central nervous system homeostasis, providing nutrition to neurons, maintaining the integrity of the blood–brain barrier, regulating synaptic activity and processing cell metabolites (Verkhatsky and

Nedergaard 2018). In order to mimic astrocytes function, we used C6 glial cell line in the present study. These cells present the increased expression of some astrocyte markers and seems to reproduce an astrocyte in a significant way (Galland et al. 2019).

Concerning to the effects in the nervous system, MIC-LR seems to affect the dopaminergic neurotransmission besides to enhance OS and cytoskeleton disruption in animal models (Wu et al. 2016; Zhang et al. 2018; Shin et al. 2018). MIC-LR has also been implicated as a potential environmental factor in Alzheimer's disease because of its potent inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A) activity and its ability to cause impairment of memory and cognitive function associated with Alzheimer's disease when intraperitoneally injected in rats (Li et al. 2014). Furthermore, 15 µg/L of MC-LR in drinking water also caused hypokinesia in mice and induced survival loss and apoptosis of dopaminergic neurons, resulting in a reduction in dopamine content, which are pathological features of Parkinson's disease (Yan et al. 2022). Although MIC-LR presented the capacity to induce changes physiology consistent with neurodegeneration in primary astrocyte culture (D'Mello et al. 2017), this is the first study showing oxidative damage caused by MIC-LR in glia cells. Since MIC-LR at a concentration of 10 µM induced RS generation, cell death SH groups depletion and CAT activity inhibition, this concentration was used in the further studies.

URO-A directly administered to rats was reported to be safe in a 28- and 90-day oral studies. Also, URO-A is not genotoxic and the NOAEL was greater than 3.000 mg/kg/day in rats (Heilman et al. 2017). In agreement, no significant differences were observed on cell viability and content of total SH groups between control cells and those treated with concentrations of URO-A ranging from 3 to 100 µM ( $p > 0.05$ , Figure 2A and 2C). However, the treatment of cells with URO-A at 60 and 100 µM induced CAT inhibition ( $p < 0.05$ , Figure 2D) along with a trend to increase RS generation

( $p > 0.05$ , figure 2B), suggesting that URO-A, at higher concentrations, can exert a pro-oxidant effect. While large molecular-weight PC, such as ETs, have little or no pro-oxidant properties, small PC (such as UROs) can exhibit considerable pro-oxidant activity. A proposed mechanism suggests that UROs reduce  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^+$  and, subsequently,  $\text{Cu}^+$  is re-oxidized in a Fenton-like reaction by the action of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or  $\text{O}_2$ , leading to the RS generation (Kallio et al. 2013). This agrees with a previous *in silico* study which reported that the constituents of pomegranate juice (including URO-A) have the potential to inhibit key enzymes of the neuronal antioxidant defence system, such as CAT, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione-S-transferase. As far as we know, this is the first study showing pro-oxidant effects of URO-A in nervous system cells. This may be of extreme importance in neurodegenerative diseases, where neurons are known to be more vulnerable to OS (Mazumder et al. 2019). This way, the findings of the present study suggest that lower URO-A concentrations (3-30  $\mu\text{M}$ ) may be suitable to further studies in C6 cells. In agreement, lower concentrations of URO-A (2.5-10  $\mu\text{M}$ ) inhibited microglia-mediated neuroinflammation and neurodegeneration in experimental model of PD (Qiu et al. 2022). Despite of this facts, URO-A received a favourable review by the US Food and Drug Administration, where it is generally recognized as safe (GRAS) and can be used as a food ingredient at levels up to 1000 mg/serving, equivalent to dietary exposure to URO-A of 1183 mg/day (Keefe and Nutrition 2018).

Nowadays, there is a widespread tendency to think that UROs, rather than EA, could be the actual bioactive molecules responsible for benefits coming from ETs and EA rich foods. Although *in vitro* findings have shown that EA and UROs are equally active, studies *in vivo* show that only UROs have been found in fluids, cells, and tissues (Alfei et al. 2020). URO-A did not attenuate the cell viability loss and CAT activity

inhibition caused by MIC-LR (Figure 3A and 3D,  $p > 0.05$ ). Previously studies showed suppression of enzymatic expression of CAT in situations where OS is exacerbated in the *in vivo* environment (Gonchar et al. 2006; Hu and Da 2014). Thus, we can speculate that RS generation by MIC-LR overwhelmed antioxidant activity of URO-A, causing CAT activity inhibition and cell death. However, URO-A proved to be effective in attenuating the RS generation and the depletion of total SH groups induced by MIC-LR (Figure 3B and 3C,  $p < 0.05$ ), as cells pre-treated with URO-A presented lower RS generation and higher content of SH groups when compared to the cells treated only with MIC-LR (Figure 3B and 3C,  $p < 0.05$ ). This corroborates the antioxidant potential of URO-A (Wang et al. 2015; Ahsan et al. 2019; Kikuchi et al. 2021). Accordingly, URO-A was able to increase the expression of the antioxidant proteins peroxiredoxins 1 and 3 (Komatsu et al. 2018), as well as, attenuates production of pro-inflammatory mediators by suppressing ROS generation in macrophages (Boakye et al. 2018).

Regarding antioxidant effects in nervous system, URO-A (along with URO-B) improved the survival of human neuroblastoma cells (SK-N-MC impaired by oxidative stress induced by incubation with 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) (Verzelloni et al. 2011). Moreover, URO-A and URO-B, as well as their methylated conjugates, showed protective effect against neurotoxicity induced by  $\beta$ -amyloid in the nematode *C. elegans* (Yuan et al. 2016). Additionally, URO-A and other PC metabolites prevented neuronal apoptosis via attenuation of RS levels and increased REDOX activity in SH-SY5Y cells (González-Sarrías et al. 2017). These antioxidant effects have been associated to a direct radical scavenger and an inhibitor of oxidases abilities, but also to the improvement of the cellular antioxidant battery (Cásedas et al. 2020) (Casedas et al., 2020). Additionally, URO-A increased cell viability and decreased intracellular RS production in a dose-dependent manner in SK-N-MC cells



(Kim et al. 2020). For the best of our knowledge, this is the first report on the antioxidant effect of URO-A against oxidative stress induced by MIC-LR in glia cells.

In the present study, the pre-treatment of C6 cells with URO-A was prevented RS generation and depletion of SH groups, but not CAT inhibition and cell death caused by MIC-LR. We can suggest that mechanisms other than RS generation are involved in cellular death and CAT inhibition caused by MIC-LR and these mechanisms are not fully covered by URO-A antioxidant capacity. In agreement, besides OS, the main mechanisms of MICs toxicity include to affect GABAergic neurons, to impair neurochannels and to change structural brain proteins, leading to cytoskeleton disruption(Hinojosa et al. 2019). Furthermore, MIC-LR was demonstrated to bind to CAT, leading to conformational changes in this enzyme that affect its physiological response (Hu and Da 2014). For the best of our knowledge, this is the first study evaluating the protective effect of URO-A against MIC-LR toxicity.

## **Conclusion**

MIC-LR at concentrations of 1 and 10  $\mu$ M generated RS, depleted SH groups and reduced cell viability of C6 cells. Moreover, the highest concentration of MIC-LR inhibited CAT activity. Besides being safe for glia cells, URO-A at 3  $\mu$ M prevented RS generation and SH groups depletion induced by MIC-LR. However, this concentration did not attenuate cell death and CAT inhibition induced by the toxin. Thus, URO-A may be helpful to MIC-LR-induced damage in glia cells by preventing RS generation and by restoring the oxidative status of proteins (content of SH groups). Additional studies need to be carried out before a final statement on the role of this colonic metabolite in prevention or therapeutic of MIC-LR intoxications.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their financial support.

## Declaration of interest statement

The authors have declared that there is no conflict of interest.

## References

- Aebi H. 1984. [13] Catalase in vitro [Internet]. In: [place unknown]; p. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aguilar-Zarate P, Wong-Paz JE, Buenrostro-Figueroa JJ, Ascacio JA, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. 2018. Ellagitannins: Bioavailability, Purification and Biotechnological Degradation. *Mini-Reviews Med Chem* [Internet]. 18(15):1244–1252. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170208144742>
- Ahsan A, Zheng Y, Wu X, Tang W, Liu M, Ma S, Jiang L, Hu W, Zhang X, Chen Z. 2019. Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress in vitro and in vivo. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 25(9):976–986. <https://doi.org/10.1111/cns.13136>
- Alfei S, Marengo B, Zuccari G. 2020. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants* [Internet]. 9(8):707. <https://doi.org/10.3390/antiox9080707>
- Amado LL, Monserrat JM. 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environ Int* [Internet]. 36(2):226–235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.010>
- Arman T, Clarke J. 2021. Microcystin Toxicokinetics, Molecular Toxicology, and Pathophysiology in Preclinical Rodent Models and Humans. *Toxins (Basel)* [Internet]. 13(8):537. <https://doi.org/10.3390/toxins13080537>

- Augusti PR, Brasil AVS, Souto C, Göethel G, de Oliveira Rios A, Emanuelli T, Bürger ME, Garcia SC. 2017. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 109:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.045>
- Azevedo SMF., Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology* [Internet]. 181–182:441–446. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)
- Boakye YD, Groyer L, Heiss EH. 2018. An increased autophagic flux contributes to the anti-inflammatory potential of urolithin A in macrophages. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 1862(1):61–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.006>
- Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* [Internet]. 109(7):663–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109663>
- Cásedas G, Les F, Choya-Foces C, Hugo M, López V. 2020. The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants* [Internet]. 9(2):177. <https://doi.org/10.3390/antiox9020177>
- Chen J, Xie P, Li L, Xu J. 2009. First Identification of the Hepatotoxic Microcystins in the Serum of a Chronically Exposed Human Population Together with Indication of Hepatocellular Damage. *Toxicol Sci* [Internet]. 108(1):81–89. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp009>
- Chen P, Chen F, Lei J, Li Q, Zhou B. 2019. Activation of the miR-34a-Mediated SIRT1/mTOR Signaling Pathway by Urolithin A Attenuates d-Galactose-Induced Brain Aging in Mice. *Neurotherapeutics* [Internet]. 16(4):1269–1282. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00753-0>
- D'Mello F, Braidy N, Marçal H, Guillemin G, Rossi F, Chinian M, Laurent D, Teo C, Neilan BA. 2017. Cytotoxic Effects of Environmental Toxins on Human Glial Cells. *Neurotox Res* [Internet]. 31(2):245–258. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9678-5>
- D'Amico D, Andreux PA, Valdés P, Singh A, Rinsch C, Auwerx J. 2021. Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends Mol Med* [Internet]. 27(7):687–699. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.009>
- Djedjibegovic J, Marjanovic A, Panieri E, Saso L. 2020. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020:1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/5194508>
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 82(1):70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

Fernández-Ochoa Á, Cádiz-Gurrea M de la L, Fernández-Moreno P, Rojas-García A, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. 2022. Recent Analytical Approaches for the Study of Bioavailability and Metabolism of Bioactive Phenolic Compounds. *Molecules* [Internet]. 27(3):777. <https://doi.org/10.3390/molecules27030777>

Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 203(3):257–263. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012>

Galland F, Seady M, Taday J, Smaili SS, Gonçalves CA, Leite MC. 2019. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int* [Internet]. 131:104538. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>

Gonchar O, Mankovskaya I, Klyuchko E. 2006. Role of complex nucleosides in the reversal of oxidative stress and metabolic disorders induced by acute nitrite poisoning. *Indian J Pharmacol* [Internet]. 38(6):414. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.28208>

González-Sarriás A, Núñez-Sánchez MÁ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. 2017. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *J Agric Food Chem* [Internet]. 65(4):752–758. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04538>

Gou T, Ma Q-L, Wang Z-X, Wang L, Yao L-A, Xu Z-C, Zhao X-M, Liang R-C, Lan Y. 2017. [Eutrophication and Characteristics of Cyanobacteria Bloom in the Summer in Guishi Reservoir]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue* [Internet]. 38(10):4141–4150. <https://doi.org/10.13227/j.hjkx.201702098>

Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A. 2021. Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. *Adv Nutr* [Internet]. 12(4):1211–1238. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab007>

Guzmán-Guillén R, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Prieto A, Pichardo S, Jos Á, Campos A, Vasconcelos V, Cameán A. 2017. Potential Use of Chemoprotectants against the Toxic Effects of Cyanotoxins: A Review. *Toxins (Basel)* [Internet]. 9(6):175. <https://doi.org/10.3390/toxins9060175>

Heilman J, Andreux P, Tran N, Rinsch C, Blanco-Bose W. 2017. Safety assessment of Urolithin A, a metabolite produced by the human gut microbiota upon dietary intake of plant derived ellagitannins and ellagic acid. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 108:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.050>

Hinojosa MG, Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Guzmán-Guillén R, Jos A, Cameán AM. 2019. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. *Sci Total Environ* [Internet]. 668:547–565. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>

Hu Y, Chen J, Fan H, Xie P, He J. 2016. A review of neurotoxicity of microcystins.

Environ Sci Pollut Res [Internet]. 23(8):7211–7219. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6073-y>

Hu Y, Da L. 2014. Insights into the selective binding and toxic mechanism of microcystin to catalase. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 121:230–237. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.078>

Ishimoto H, Shibata M, Myojin Y, Ito H, Sugimoto Y, Tai A, Hatano T. 2011. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 21(19):5901–5904. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.086>

Kallio T, Kallio J, Jaakkola M, Mäki M, Kilpeläinen P, Virtanen V. 2013. Urolithins Display both Antioxidant and Pro-oxidant Activities Depending on Assay System and Conditions. *J Agric Food Chem* [Internet]. 61(45):10720–10729. <https://doi.org/10.1021/jf403208d>

Keefe DM (Center for FS, Nutrition and AN. 2018. GRAS Notice No. GRN 000791 [Internet]. [place unknown]. <https://www.fda.gov/media/120300/download>

Kikuchi H, Harata K, Madhyastha H, Kuribayashi F. 2021. Ellagic acid and its fermentative derivative urolithin A show reverse effects on the gp91-phox gene expression, resulting in opposite alterations in all-trans retinoic acid-induced superoxide generating activity of U937 cells. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 25:100891. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100891>

Kim KB, Lee S, Kim JH. 2020. Neuroprotective effects of urolithin A on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress-mediated apoptosis in SK-N-MC cells. *Nutr Res Pract* [Internet]. 14(1):3. <https://doi.org/10.4162/nrp.2020.14.1.3>

Komatsu W, Kishi H, Yagasaki K, Ohhira S. 2018. Urolithin A attenuates pro-inflammatory mediator production by suppressing PI3-K/Akt/NF-κB and JNK/AP-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages: Possible involvement of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 833:411–424. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.023>

Kujawska M, Jourdes M, Kurpik M, Szulc M, Szafer H, Chmielarz P, Kreiner G, Krajka-Kuźniak V, Mikołajczak PŁ, Teissedre P-L, Jodynis-Liebert J. 2019. Neuroprotective Effects of Pomegranate Juice against Parkinson's Disease and Presence of Ellagitannins-Derived Metabolite—Urolithin A—In the Brain. *Int J Mol Sci* [Internet]. 21(1):202. <https://doi.org/10.3390/ijms21010202>

Li G, Yan W, Dang Y, Li J, Liu C, Wang J. 2015. The role of calcineurin signaling in microcystin-LR triggered neuronal toxicity. *Sci Rep* [Internet]. 5(1):11271. <https://doi.org/10.1038/srep11271>

Li X-B, Zhang X, Ju J, Li Y, Yin L, Pu Y. 2014. Alterations in neurobehaviors and inflammation in hippocampus of rats induced by oral administration of microcystin-LR. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 21(21):12419–12425.

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3151-x>

Liang Y, Chen X, Lu X, Jin S, Min Y, Yang J. 2017. Combined effects of microcystin and nitrite on the growth, lipid peroxidation, and antioxidant responses of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat Toxicol* [Internet]. 192:78–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.013>

Madeira Junior JV, Teixeira CB, Macedo GA. 2015. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 35(1):75–81. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.803020>

Maldonado PA, Negrini LA, Kaizer RR, Zanin RF, Araújo M do C, Battisti V, Morsch VM, Schetinger MRC. 2006. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. *Clin Chim Acta* [Internet]. 366(1–2):174–178. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.025>

Mazumder MK, Choudhury S, Borah A. 2019. An in silico investigation on the inhibitory potential of the constituents of Pomegranate juice on antioxidant defense mechanism: Relevance to neurodegenerative diseases. *IBRO Reports* [Internet]. 6:153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.05.003>

Melaram R, Newton AR, Chafin J. 2022. Microcystin Contamination and Toxicity: Implications for Agriculture and Public Health. *Toxins (Basel)* [Internet]. 14(5):350. <https://doi.org/10.3390/toxins14050350>

Qiu J, Chen Y, Zhuo J, Zhang L, Liu J, Wang B, Sun D, Yu S, Lou H. 2022. Urolithin A promotes mitophagy and suppresses NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells and MPTP-induced Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* [Internet]. 207:108963. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.108963>

Shin E-J, Hwang YG, Pham DT, Lee JW, Lee YJ, Pyo D, Jeong JH, Lei XG, Kim H-C. 2018. Glutathione peroxidase-1 overexpressing transgenic mice are protected from neurotoxicity induced by microcystin-leucine-arginine. *Environ Toxicol* [Internet]. 33(10):1019–1028. <https://doi.org/10.1002/tox.22580>

Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, Carmichael WW, Azevedo SMFO. 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Toxicol* [Internet]. 21(2):95–103. <https://doi.org/10.1002/tox.20160>

Stasiuk M, Kozubek A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 67(6):841–860. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>

Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* [Internet]. 114(8):785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Lužanin Z, Munjas AM, Nikolin B, Vuleta D, Meriluoto J. 2014. Epidemiology of Cancers in Serbia and Possible Connection with Cyanobacterial Blooms. *J Environ Sci Heal Part C* [Internet]. 32(4):319–337. <https://doi.org/10.1080/10590501.2014.967053>

Tomás-Barberán FA, González-Sarrías A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MA, Selma M V., García-Conesa MT, Espín JC. 2017. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 61(1):1500901. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500901>

Toney AM, Fox D, Chaidez V, Ramer-Tait AE, Chung S. 2021. Immunomodulatory Role of Urolithin A on Metabolic Diseases. *Biomedicines* [Internet]. 9(2):192. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020192>

Verkhatsky A, Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* [Internet]. 98(1):239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Verzelloni E, Pellacani C, Tagliazucchi D, Tagliaferri S, Calani L, Costa LG, Brighenti F, Borges G, Crozier A, Conte A, Del Rio D. 2011. Antigliocative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 55(S1):S35–S43. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000525>

Wang H, Joseph JA. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader<sup>1</sup>Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imp. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 27(5–6):612–616. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)

Wang Y, Qiu Z, Zhou B, Liu C, Ruan J, Yan Q, Liao J, Zhu F. 2015. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. 29(5):1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.008>

Wu Q, Yan W, Liu C, Li L, Yu L, Zhao S, Li G. 2016. Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo. *Environ Pollut* [Internet]. 213:793–800. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.048>

Yamada H, Wakamori S, Hirokane T, Ikeuchi K, Matsumoto S. 2018. Structural Revisions in Natural Ellagitannins. *Molecules* [Internet]. 23(8):1901. <https://doi.org/10.3390/molecules23081901>

Yan M, Jin H, Pan C, Hang H, Li D, Han X. 2022. Movement Disorder and Neurotoxicity Induced by Chronic Exposure to Microcystin-LR in Mice. *Mol Neurobiol* [Internet]. 59(9):5516–5531. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02919-y>

Yuan T, Ma H, Liu W, Niesen DB, Shah N, Crews R, Rose KN, Vatter DA, Seeram NP. 2016. Pomegranate’s Neuroprotective Effects against Alzheimer’s Disease Are Mediated by Urolithins, Its Ellagitannin-Gut Microbial Derived Metabolites. *ACS*

Chem Neurosci [Internet]. 7(1):26–33.

<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5b00260>

Yuan Y, Zheng S, Zeng L, Deng Z, Zhang B, Li H. 2019. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. *J Food Sci* [Internet]. 84(12):3850–3865. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14934>

Zeb A. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem* [Internet]. 44(9). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

Zhang C, Wang J, Zhu J, Chen Y, Han X. 2020. Microcystin-leucine-arginine induced neurotoxicity by initiating mitochondrial fission in hippocampal neurons. *Sci Total Environ*. 703:134702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134702>

Zhang M, Cui S, Mao B, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, Tang X, Chen W. 2022. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet].:1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2036693>

Zhang Y, Zhang J, Wang E, Qian W, Fan Y, Feng Y, Yin H, Li Y, Wang Y, Yuan T. 2018. Microcystin-Leucine-Arginine Induces Tau Pathology Through B $\alpha$  Degradation via Protein Phosphatase 2A Demethylation and Associated Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Phosphorylation. *Toxicol Sci* [Internet]. 162(2):475–487. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx271>



## Figures legends

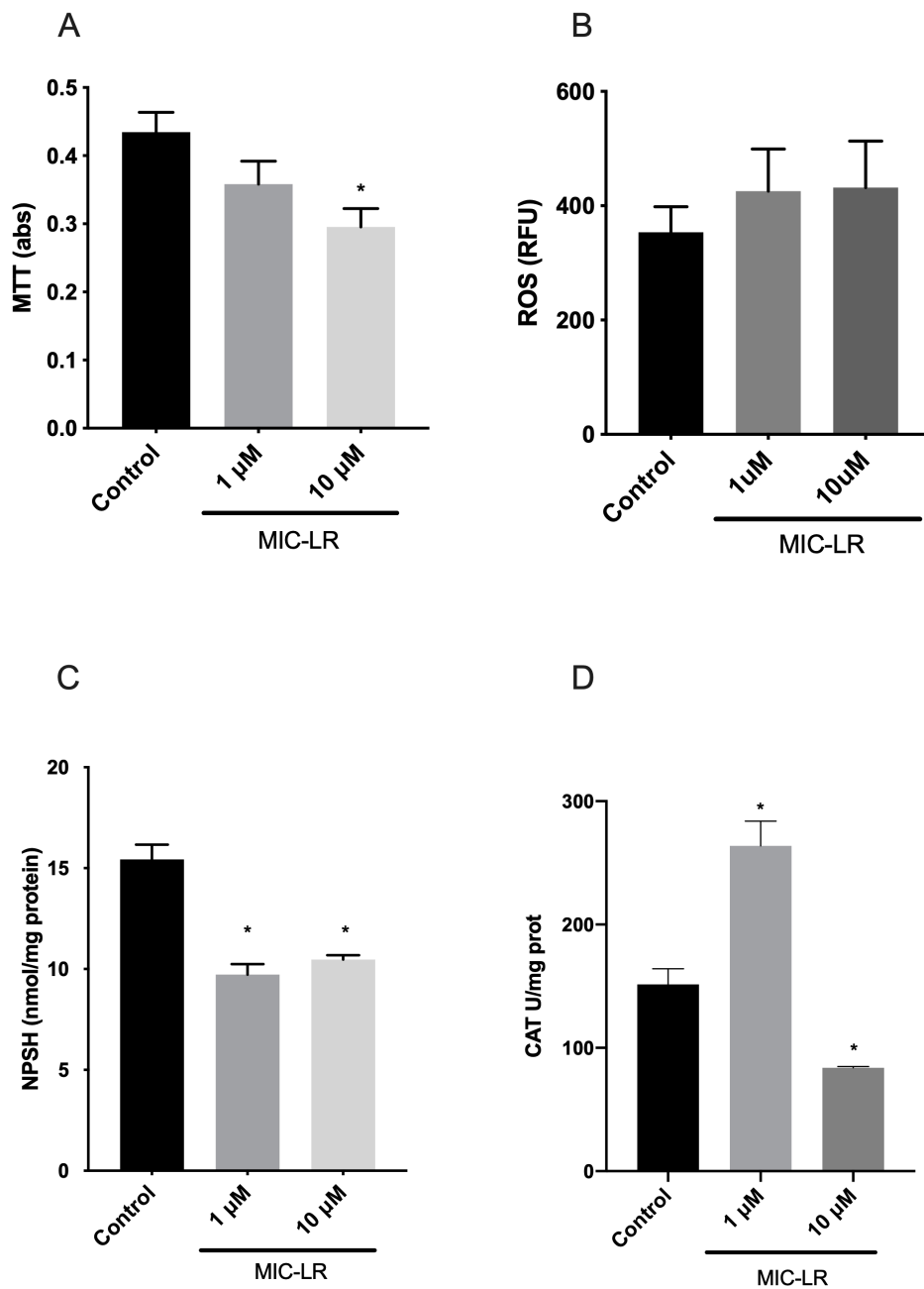


Figure 1. Cell viability (A), RS generation (B), total SH groups (C) and CAT activity (D) in C6 cells exposed to MIC-LR (1 and 10  $\mu$ M) for 24h. Results are mean  $\pm$  SEM (n=5). \*Different from control group; Abs = absorbance; RFU = relative fluorescence

units.

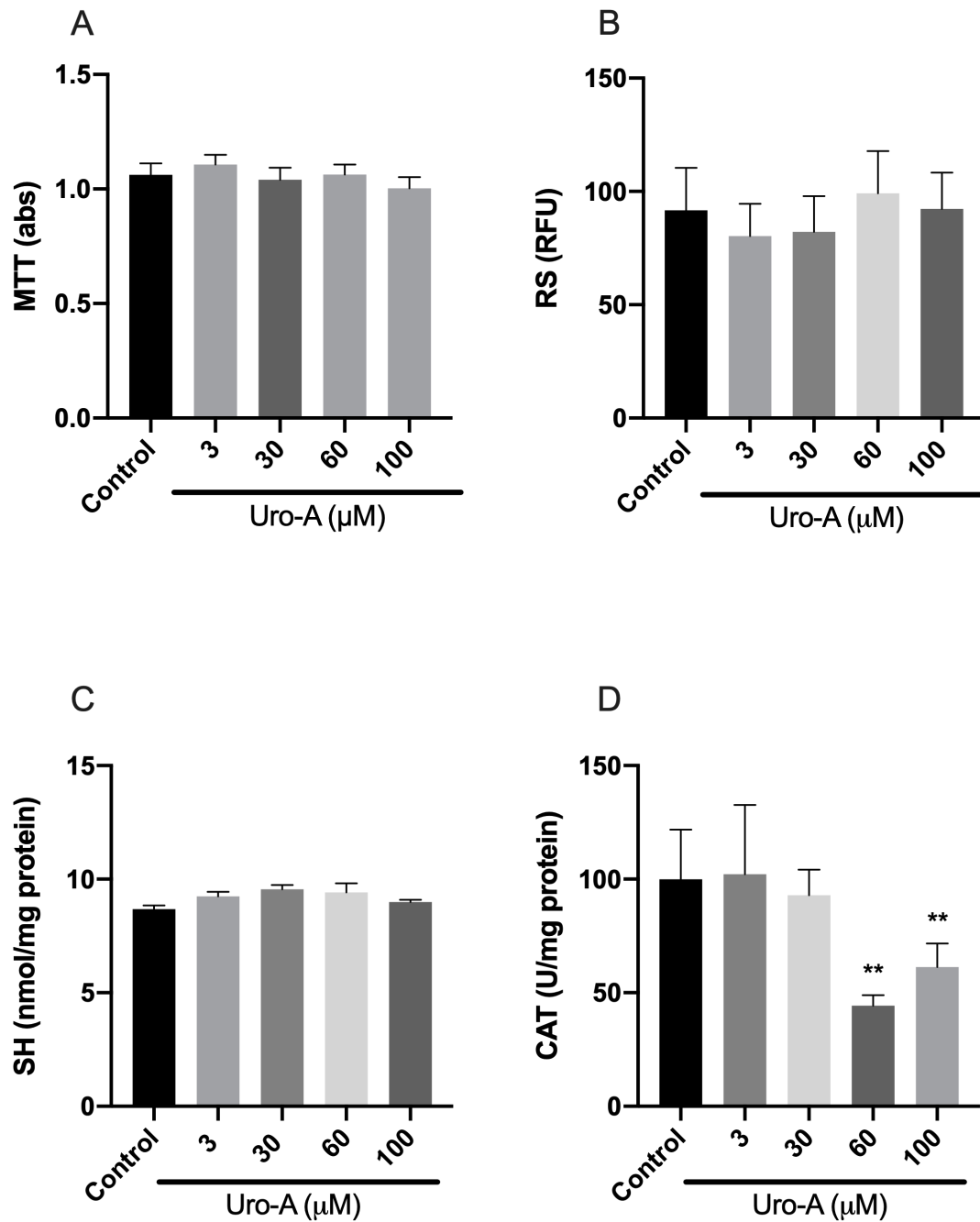


Figure 2. Cell viability (A), RS generation (B), total SH groups (C) and CAT activity (D) in C6 cells treated with URO-A (0, 3, 30, 60  $\mu\text{M}$ ) for 24h. Results are mean  $\pm$  SEM (n=5). \* Different from control group; Abs = absorbance; RFU = relative fluorescence units.

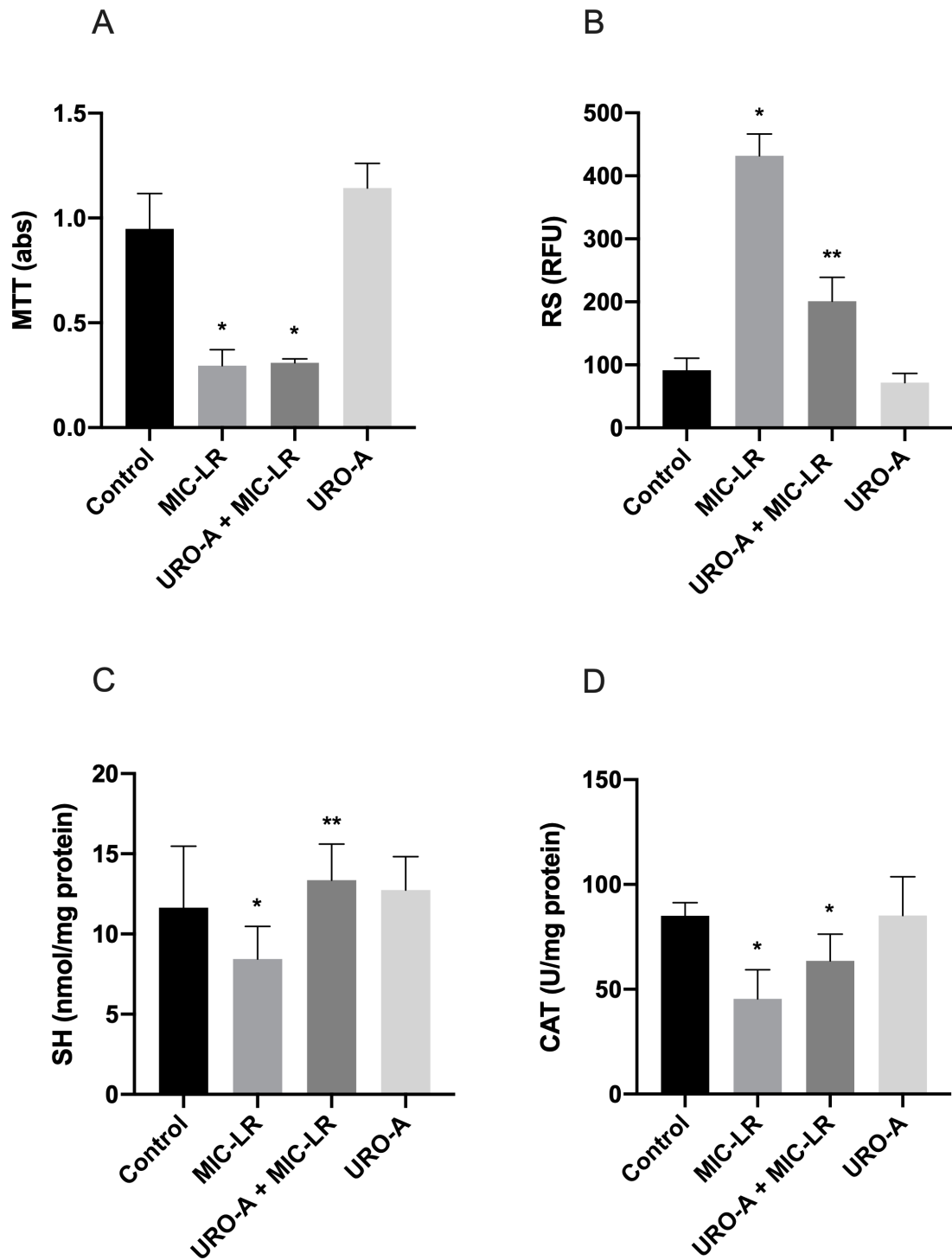


Figure 3. Cell viability (A), RS generation (B), total SH groups (C) and CAT activity (D) in C6 cells pre-treated with URO-A (3 $\mu$ M) for 24h followed by MIC-LR exposure (10  $\mu$ M) for 24h. Results are mean  $\pm$  SEM (n=5). \* Different from control group; \*\* Different from MIC-LR group. Abs = absorbance; RFU = relative fluorescence units.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Algumas variáveis demonstram a necessidade da busca por opções acessíveis e eficazes na terapêutica da intoxicação por MIC-LR, como a ausência de terapêuticas nas intoxicações por MIC-LR, a elucidação do mecanismo de ação de intoxicação, e efeitos neurotóxicos (Carmichael et al. 2001; Gou et al. 2017; Arman and Clarke 2021).

Através dos ensaios experimentais realizados, o grupo objetivou corroborar com os achados de outros autores sobre a afirmativa da neurotoxicidade induzida pela MIC-LR (Zhang et al. 2020; Yan et al. 2022). Desta forma, as células C6 foram tratadas com 1 e 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR e apresentaram aumento da geração de ER associado a morte celular quando comparadas ao grupo controle (ausência de MIC-LR). Klima *et al.* (2021) também identificaram redução da viabilidade celular quando neurônios periféricos foram tratados com 5  $\mu\text{M}$  de MIC-LR e também a presença de neuroinflamação na quanto tratados com 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR. Shin *et al.* (2018) expuseram ratos à diferentes concentrações de MIC-LR e também observaram alterações na geração de ER e uma redução da expressão de enzimas antioxidantes endógenas como a GPX e também das SODs.

Ainda sobre sistema enzimático antioxidante, foi possível observar que apenas a maior concentração de MIC-LR (10  $\mu\text{M}$ ) causou redução na atividade da CAT quando comparado ao controle. Isso provavelmente ocorreu devido a uma geração excessiva de ER que sobrecarregou as defesas antioxidantes, causando inibição de CAT e perda de viabilidade celular, como já observado anteriormente (Gonchar et al. 2006; Liang et al. 2017). Não podemos descartar que a inibição da atividade da CAT possa estar associada à geração de RS e à morte celular observada em células tratadas com 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR. De fato, alguns autores já demonstraram que MIC-LR pode se ligar a CAT, gerando um complexo proteico e levando a alterações conformacionais nessa enzima que afetam sua resposta fisiológica (Gonchar et al. 2006; Hu and Da 2014).

Desta forma, os dados demonstraram que o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de MIC-LR durante 24 h induziram a morte de células C6 através da geração de ER, bem como comprometimento do sistema antioxidante. Isso corrobora relatos anteriores sobre neurotoxicidade de MIC-LR (P.R. Augusti et al. 2017) onde MIC-LR causou dano

oxidativo em *Caenorhabditis elegans*, um organismo sem fígado e um modelo conhecido para avaliação de neurotoxicidade. Além disso, o OATP1A2 (transportador de MIC-LR) é expresso na barreira hematoencefálica em humanos e esse dado acaba por sustentar o transporte da MIC-LR para os neurônios (FISCHER *et al.*, 2005; HINOJOSA *et al.*, 2019).

Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular entre as células controle e aquelas tratadas com diferentes concentrações de URO-A, sugerindo a segurança de URO-A em células C6. No entanto, o tratamento das células com URO-A a 60 e 100  $\mu\text{M}$  induziu inibição da CAT, demonstrando que URO-A, em concentrações mais altas, pode prejudicar essa enzima antioxidante tendo em vista que a URO-A pode interferir no sítio catalítico dessa enzima (Mazumder *et al.* 2019). Não foram observadas diferenças estatísticas na geração de ER em células tratadas com URO-A. No entanto, as células tratadas com 60 e 100  $\mu\text{M}$  de URO-A apresentaram uma tendência ao aumento da geração de ER, Alguns autores relataram que altas concentrações de URO-A podem ter efeitos prooxidantes, sendo indicado que a concentração não citotóxica de URO-A fica entre as concentrações fisiológicas de 0,5–50  $\mu\text{M}$ . (Mazumder *et al.* 2019; Cásedas *et al.* 2020). Esses resultados sugerem que concentrações mais baixas de URO-A podem ser adequadas para estudos posteriores.

A MIC-LR em uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  induziu geração de ER, morte celular e inibição da atividade de CAT. Assim, esta concentração foi utilizada nos estudos posteriores. Em relação ao URO-A, as próximas etapas do estudo foram realizadas usando a menor concentração (3  $\mu\text{M}$ ) para evitar qualquer toxicidade do URO-A às células.

Com relação ao ensaio de viabilidade celular, foi possível observar que a URO-A não foi capaz de reduzir a viabilidade celular perdida pelo tratamento com MIC-LR. Embora o URO-A não tenha sido eficiente em atenuar a perda de viabilidade celular induzida por MIC-LR, ele se mostrou eficaz no ensaio DCF-DA que compreende a geração de ER. Foi possível observar que células pré-tratadas com URO-A apresentaram menor geração de ER quando comparadas às células tratadas apenas com MIC-LR, corroborando assim o potencial antioxidante *in vitro* de URO-A (Wang *et al.* 2015; Ahsan *et al.* 2019; Kikuchi *et al.* 2021).

Em relação às defesas antioxidantes, URO-A não foi capaz de atenuar a inibição da atividade de CAT induzida por MIC-LR. Estudos anteriores mostraram supressão da expressão enzimática de CAT em situações em que o estresse oxidativo é exacerbado no ambiente *in vivo* (Gonchar et al. 2006; Hu and Da 2014). Assim, não podemos descartar que a geração de ER superou a atividade antioxidante da URO-A, causando inibição da atividade de CAT e morte celular. Adicionalmente, a ausência de efeito da URO-A contra a inibição de CAT pode estar associada à incapacidade de URO-A em prevenir a morte celular causada por MIC-LR.

A interação entre microbiota e AE no cólon causa um duplo efeito: (i) O AE apresenta um efeito prebiótico, estimulando o crescimento de microrganismos benéficos e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas; e (ii) o AE é metabolizado pela microbiota, passando por um processo de biotransformação e gerando produtos como a URO-A (MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2015; ZHANG *et al.*, 2022). Hoje em dia, existe uma tendência generalizada de pensar que as URO, ao invés do AE, poderiam ser as moléculas bioativas reais responsáveis pelos benefícios provenientes de ETs e alimentos ricos em AE. Tanto o AE derivado de framboesa quanto a URO-A apresentaram efeitos anti-inflamatórios em células da micróglia. Entretanto, apenas a URO-A foi capaz de suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios ativados por lipopolissacarídeo (Toney et al. 2020). Embora achados *in vitro* tenham mostrado que EA e URO são igualmente ativos, estudos *in vivo* mostram que apenas as URO foram encontrados em fluidos, células e tecidos (Alfei et al. 2020).

Muitos autores demonstraram efeitos do URO-A na fosforilação da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt (uma importante via de processo envolvida com proliferação, apoptose, autofagia e captação de glicose) e no aumento da expressão de peroxirredoxinas 1 e 3 (Komatsu et al. 2018; Cásedas et al. 2020). Além disso, URO-A atenua a produção de mediadores pró-inflamatórios suprimindo a geração de EROs em macrófagos gerada pelas MICs (Komatsu et al. 2018). Apesar dos efeitos benéficos associados a URO-A, no presente estudo este metabólito colônico não foi capaz de proteger as células C6 contra a morte celular e perda de atividade antioxidante causadas pela MIC-LR. Podemos sugerir que outros mecanismos além da geração de ER estão envolvidos na morte celular e na inibição da CAT causados pela MIC-LR e que tais mecanismos não sofrem influência da URO-A. Como já

relatado anteriormente, a MIC-LR se liga a CAT e gera um complexo inativo (Gonchar et al. 2006; Hu and Da 2014) e a URO-A não seria capaz de atuar nesse mecanismo. Para constar, este é o primeiro estudo avaliando o efeito protetor do URO-A contra a toxicidade da MIC-LR.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

- MIC-LR, nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$ , induziu geração de ER e causou morte celular em células C6. Além disso, a concentração de 10  $\mu\text{M}$ , de MIC-LR causou inibição da enzima antioxidante CAT nas células gliais.
- Altas concentrações de URO-A (60 e 100  $\mu\text{M}$ ) causaram inibição na atividade da CAT e apresentaram uma tendência em aumentar a geração de ER. Concentrações menores (3 e 30  $\mu\text{M}$ ) não apresentaram sinais de toxicidade para as células gliais.
- URO-A 3  $\mu\text{M}$  preveniu completamente a geração de ER induzida por MIC-LR em células C6. Entretanto, nenhum efeito foi observado contra a morte celular e inibição da atividade da CAT

Os resultados do presente trabalho demonstram que a URO-A pode oferecer efeito protetor contra a toxicidade causada pela MIC-LR ao restaurar os níveis de ER geradas. Desta maneira, a URO-A aparece como alternativa promissora como adjunto na prevenção ou terapêutica de intoxicações por MIC. Estudos adicionais com outras concentrações de URO-A são recomendados antes de conclusões acerca do potencial benéfico desse metabolito.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Daim MM, Sayed AA, Abdeen A, Aleya L, Ali D, Alkahtane AA, Alarifi S, Alkahtani S. 2019. Piperine Enhances the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Thymoquinone against Microcystin-LR-Induced Hepatotoxicity and Neurotoxicity in Mice. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019:1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/1309175>
- Aebi H. 1984. [13] Catalase in vitro. In: [place unknown]; p. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aguilar-Zarate P, Wong-Paz JE, Buenrostro-Figueroa JJ, Ascacio JA, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. 2018. Ellagitannins: Bioavailability, Purification and Biotechnological Degradation. *Mini-Reviews Med Chem* [Internet]. 18(15):1244–1252. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170208144742>
- Ahsan A, Zheng Y, Wu X, Tang W, Liu M, Ma S, Jiang L, Hu W, Zhang X, Chen Z. 2019. Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress in vitro and in vivo. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 25(9):976–986. <https://doi.org/10.1111/cns.13136>
- Ait Abderrahim L, Taibi K, Boussaid M, Al-Shara B, Ait Abderrahim N, Ait Abderrahim S. 2021. *Allium sativum* mitigates oxidative damages induced by Microcystin-LR in heart and liver tissues of mice. *Toxicon* [Internet]. 200:30–37. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.06.018>
- Al-Hazmi A. 2020. Antioxidant Activity of Silymarin in Microcystin-LR Cardiac and Pulmonary Induced Injuries on Mice. *Pakistan J Biol Sci* [Internet]. 23(11):1369–1373. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.1369.1373>
- Alfei S, Marengo B, Zuccari G. 2020. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? *Antioxidants* [Internet]. 9(8):707. <https://doi.org/10.3390/antiox9080707>
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM, Al AET. 2001. Biochemical and Molecular Action of Nutrients Walnut Polyphenolics Inhibit In Vitro Human Plasma and LDL Oxidation 1 , 2. *J Nutr*. 131(May):2837–2842.
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. 2007. Toxins of

cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*. 51(1):7–60.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>

Arman T, Clarke J. 2021. Microcystin Toxicokinetics, Molecular Toxicology, and Pathophysiology in Preclinical Rodent Models and Humans. *Toxins (Basel)* [Internet]. 13(8):537. <https://doi.org/10.3390/toxins13080537>

Augusti P.R., Brasil AVS, Souto C, Göethel G, de Oliveira Rios A, Emanuelli T, Bürger ME, Garcia SC. 2017. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chem Toxicol*. 109. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.045>

Augusti Paula Rossini, Brasil AVS, Souto C, Göethel G, de Oliveira Rios A, Emanuelli T, Bürger ME, Garcia SC. 2017. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* : Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. *Food Chem Toxicol*. 109:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.045>

Augusti PR, Conterato GMM, Denardin CC, Prazeres ID, Serra AT, Bronze MR, Emanuelli T. 2021. Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19. *J Nutr Biochem* [Internet]. 97:108787. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108787>

Azevedo SMF., Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*. 181–182:441–446. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2)

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfnas R de CG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 23(4):629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Bobowska A, Granica S, Filipek A, Melzig MF, Moeslinger T, Zentek J, Kruk A, Piwowarski JP. 2021. Comparative studies of urolithins and their phase II metabolites on macrophage and neutrophil functions. *Eur J Nutr* [Internet]. 60(4):1957–1972. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02386-y>

BRASIL. 2016. Orientações técnicas para o monitoramento de cianobactérias/cianotoxinas nos mananciais de abastecimento de água para

consumo humano [recurso eletrônico]. Brasília.

BRASIL. 2019. Manual de Usos Consuntivos da Água no Brasil - Agência Nacional de Águas. Brasília.

Brasil. Fundação Nacional de Saúde. 2013. 1º Caderno de Pesquisa em Engenharia de Saúde Pública - Estudos e pesquisas. Brasília.

Brzezinski MA. 2004. THE Si:C:N RATIO OF MARINE DIATOMS: INTERSPECIFIC VARIABILITY AND THE EFFECT OF SOME ENVIRONMENTAL VARIABLES1. *J Phycol.* 21(3):347–357. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00347.x>

Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect.* 109(7):663–668. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109663>

Cásedas G, Les F, Choya-Foces C, Hugo M, López V. 2020. The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants [Internet].* 9(2):177. <https://doi.org/10.3390/antiox9020177>

Casquilho N V., Moreira-Gomes MD, Magalhães CB, Okuro RT, Ortenzi VH, Feitosa-Lima EK, Lima LM, Barreiro EJ, Soares RM, Azevedo SMFO, et al. 2018. Oxidative imbalance in mice intoxicated by microcystin-LR can be minimized. *Toxicon [Internet].* 144:75–82. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.008>

Chen J, Xie P, Li L, Xu J. 2009. First Identification of the Hepatotoxic Microcystins in the Serum of a Chronically Exposed Human Population Together with Indication of Hepatocellular Damage. *Toxicol Sci [Internet].* 108(1):81–89. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp009>

Chen P, Chen F, Lei J, Li Q, Zhou B. 2019. Activation of the miR-34a-Mediated SIRT1/mTOR Signaling Pathway by Urolithin A Attenuates d-Galactose-Induced Brain Aging in Mice. *Neurotherapeutics [Internet].* 16(4):1269–1282. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00753-0>

Chen Z, Zhong C. 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 30(2):271–281. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>

- Cisneros-Zevallos L, Bang WY, Delgadillo-Puga C. 2020. Ellagic Acid and Urolithins A and B Differentially Regulate Fat Accumulation and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes While Not Affecting Adipogenesis and Insulin Sensitivity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 21(6):2086. <https://doi.org/10.3390/ijms21062086>
- D'Amico D, Andreux PA, Valdés P, Singh A, Rinsch C, Auwerx J. 2021. Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends Mol Med* [Internet]. 27(7):687–699. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.009>
- Djedjibegovic J, Marjanovic A, Panieri E, Saso L. 2020. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020:1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/5194508>
- Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, Lautrup S, Hasan-Olive MM, Caponio D, Dan X, et al. 2019. Mitophagy inhibits amyloid- $\beta$  and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 22(3):401–412. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>
- Fernández-Ochoa Á, de la Luz Cádiz-Gurrea M, Fernández-Moreno P, Rojas-García A, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. 2022. Recent Analytical Approaches for the Study of Bioavailability and Metabolism of Bioactive Phenolic Compounds. *Molecules*. 27(3):1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules27030777>
- de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ. 2004. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicol Environ Saf*. 59(2):151–163. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.04.006>
- Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 203(3):257–263. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012>
- Galland F, Seady M, Taday J, Smaili SS, Gonçalves CA, Leite MC. 2019. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int*. 131:104538. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104538>
- García-Villalba R, Beltrán D, Espín JC, Selma MV, Tomás-Barberán FA. 2013. Time course production of urolithins from ellagic acid by human gut microbiota. *J Agric*

Food Chem. 61(37):8797–8806. <https://doi.org/10.1021/jf402498b>

Gonchar O, Mankovskaya I, Klyuchko E, Olga G. 2006. Role of complex nucleosides in the reversal of oxidative stress stress and metabolic disorders induced by acute nitrite poisoning poisoning m o f r d n s a l o t i o n w l i c a o d u b e P ). e f r w m r f o k n o . c o l e d o w b l a M d k n i a b y e v a d . m i s t e w . 38(6).

Gou T, Ma Q-L, Wang Z-X, Wang L, Yao L-A, Xu Z-C, Zhao X-M, Liang R-C, Lan Y. 2017. [Eutrophication and Characteristics of Cyanobacteria Bloom in the Summer in Guishi Reservoir]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue*. 38(10):4141–4150. <https://doi.org/10.13227/j.hjkx.201702098>

Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A. 2021. Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. *Adv Nutr [Internet]*. 12(4):1211–1238. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab007>

Hinojosa MG, Gutiérrez-Praena D, Prieto AI, Guzmán-Guillén R, Jos A, Cameán AM. 2019. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. *Sci Total Environ*. 668:547–565. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>

Hinojosa MG, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Moreno FJ, Cameán AM, Jos A. 2019. Neurotoxic assessment of Microcystin-LR, cylindrospermopsin and their combination on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere [Internet]*. 224:751–764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.173>

Hu Y, Da L. 2014. Insights into the selective binding and toxic mechanism of microcystin to catalase. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc [Internet]*. 121:230–237. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.078>

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020. Pesquisa nacional de saneamento básico 2017: abastecimento de água e esgotamento sanitário. [place unknown].

IBGE. 2019. Estimativas da população residente para os municípios e para as unidades da federação brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2019. :26.

Ishfaq PM, Mishra S, Mishra A, Ahmad Z, Gayen S, Jain SK, Tripathi S, Mishra SK. 2022. *Inonotus obliquus* aqueous extract prevents histopathological alterations in

liver induced by environmental toxicant Microcystin. *Curr Res Pharmacol Drug Discov* [Internet]. 3:100118. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100118>

Ishimoto H, Shibata M, Myojin Y, Ito H, Sugimoto Y, Tai A, Hatano T. 2011. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 21(19):5901–5904. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.086>

Izdebska M, Hałas-Wiśniewska M, Zielińska W, Klimaszewska-Wiśniewska A, Grzanka D, Gagat M. 2018. Lidocaine induces protective autophagy in rat C6 glioma cell line. *Int J Oncol*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4668>

Kang I, Buckner T, Shay NF, Gu L, Chung S. 2016. Improvements in metabolic health with consumption of ellagic acid and subsequent conversion into urolithins: Evidence and mechanisms. *Adv Nutr*. 7(5):961–972. <https://doi.org/10.3945/an.116.012575>

Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J. 2019. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules* [Internet]. 24(2):370. <https://doi.org/10.3390/molecules24020370>

Kikuchi H, Harata K, Madhyastha H, Kuribayashi F. 2021. Ellagic acid and its fermentative derivative urolithin A show reverse effects on the gp91-phox gene expression, resulting in opposite alterations in all-trans retinoic acid-induced superoxide generating activity of U937 cells. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 25:100891. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100891>

Komatsu W, Kishi H, Yagasaki K, Ohhira S. 2018. Urolithin A attenuates pro-inflammatory mediator production by suppressing PI3-K/Akt/NF-κB and JNK/AP-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages: Possible involvement of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 833:411–424. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.023>

Kshirsagar S, Alvir RV, Pradeepkiran JA, Hindle A, Vijayan M, Ramasubramaniam B, Kumar S, Reddy AP, Reddy PH. 2022. A Combination Therapy of Urolithin A+EGCG Has Stronger Protective Effects than Single Drug Urolithin A in a Humanized Amyloid Beta Knockin Mice for Late-Onset Alzheimer's Disease. *Cells* [Internet]. 11(17):2660. <https://doi.org/10.3390/cells11172660>

- Lad A, Hunyadi J, Connolly J, Breidenbach JD, Khalaf FK, Dube P, Zhang S, Kleinhenz AL, Baliu-Rodriguez D, Isailovic D, et al. 2022. Antioxidant Therapy Significantly Attenuates Hepatotoxicity following Low Dose Exposure to Microcystin-LR in a Murine Model of Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants* [Internet]. 11(8):1625. <https://doi.org/10.3390/antiox11081625>
- Lane CA, Hardy J, Schott JM. 2018. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 25(1):59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
- Li G, Yan W, Dang Y, Li J, Liu C, Wang J. 2015. The role of calcineurin signaling in microcystin-LR triggered neuronal toxicity. *Sci Rep* [Internet]. 5(1):11271. <https://doi.org/10.1038/srep11271>
- Li X, Zhang X, Ju J, Li Y, Yin L, Pu Y. 2015. Maternal repeated oral exposure to microcystin-LR affects neurobehaviors in developing rats. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 34(1):64–69. <https://doi.org/10.1002/etc.2765>
- Liang Y, Chen X, Lu X, Jin S, Min Y, Yang J. 2017. Combined effects of microcystin and nitrite on the growth, lipid peroxidation, and antioxidant responses of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat Toxicol* [Internet]. 192:78–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.013>
- Lichtenberg D, Pinchuk I. 2015. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochem Biophys Res Commun*. 461(3):441–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>
- Liu BJ, Lu F, Wang XK, Liu WW. 2017. [Greenhouse gas emissions, carbon leakage and net carbon sequestration from afforestation and forest management: A review.]. *Ying yong sheng tai xue bao = J Appl Ecol*. 28(2):673–688. <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.201702.004>
- Liu H, Zhang X, Zhang S, Huang H, Wu J, Wang Y, Yuan L, Liu C, Zeng X, Cheng X, et al. 2018. Oxidative Stress Mediates Microcystin-LR-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in KK-1 Cells and C57BL/6 Mice Ovaries. *Front Physiol* [Internet]. 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01058>
- Liu J, Jiang J, Qiu J, Wang L, Zhuo J, Wang B, Sun D, Yu S, Lou H. 2022. Urolithin A protects dopaminergic neurons in experimental models of Parkinson's disease by promoting mitochondrial biogenesis through the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway. *Food Funct* [Internet]. 13(1):375–385. <https://doi.org/10.1039/D1FO02534A>

Liu J, Sun Y. 2015. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. *Toxicol Lett.* 236(1):1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.010>

Liubich LD, Kovalevska L, Lisyany MI, Semenova VM, Malysheva TA, Stayno LP, Vaslovych V V. 2017. TGF- $\beta$ 1 expression by glioma C6 cells in vitro. *Exp Oncol.* 39(4):258–263.

Luo C, Posen ID, Hoornweg D, MacLean HL. 2020. Modelling future patterns of urbanization, residential energy use and greenhouse gas emissions in Dar es Salaam with the Shared Socio-Economic Pathways. *J Clean Prod.* 254:119998.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119998>

Madeira Junior JV, Teixeira CB, Macedo GA. 2015. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. *Crit Rev Biotechnol [Internet]*. 35(1):75–81. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.803020>

Mazumder MK, Choudhury S, Borah A. 2019. An in silico investigation on the inhibitory potential of the constituents of Pomegranate juice on antioxidant defense mechanism: Relevance to neurodegenerative diseases. *IBRO Reports [Internet]*.

6:153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.05.003>

Melaram R, Newton AR, Chafin J. 2022. Microcystin Contamination and Toxicity: Implications for Agriculture and Public Health. *Toxins (Basel) [Internet]*. 14(5):350.

<https://doi.org/10.3390/toxins14050350>

Murota K, Nakamura Y, Uehara M. 2018. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci Biotechnol Biochem [Internet]*. 82(4):600–610.

<https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>

Nguyen TTN, Némery J, Gratiot N, Strady E, Tran VQ, Nguyen AT, Aimé J, Payne A. 2019. Nutrient dynamics and eutrophication assessment in the tropical river system of Saigon - Dongnai (southern Vietnam). *Sci Total Environ.* 653:370–383.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.319>

Peixoto H, Roxo M, Krstin S, Wang X, Wink M. 2016. Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. *J Funct Foods.* 26:385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.012>



- Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 97:55–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Qian H, Liu G, Lu T, Sun L. 2018. Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf.* 151:35–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.059>
- Sies H. 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* [Internet]. 4:180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. 2020. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Res Int* [Internet]. 132:109114.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114>
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, Carmichael WW, Azevedo SMFO. 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Toxicol.* 21(2):95–103.  
<https://doi.org/10.1002/tox.20160>
- Spoof L, Catherine A. 2017. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins. In: *Handb Cyanobacterial Monit Cyanotoxin Anal.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 526–537. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.app3>
- Stasiuk M, Kozubek A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cell Mol Life Sci.* 67(6):841–860. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>
- Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Lužanin Z, Munjas AM, Nikolin B, Vuleta D, Meriluoto J. 2014. Epidemiology of Cancers in Serbia and Possible Connection with Cyanobacterial Blooms. *J Environ Sci Heal Part C* [Internet]. 32(4):319–337.  
<https://doi.org/10.1080/10590501.2014.967053>
- Toney AM, Albusharif M, Works D, Polenz L, Schlange S, Chaidez V, Ramer-Tait AE, Chung S. 2020. Differential Effects of Whole Red Raspberry Polyphenols and Their Gut Metabolite Urolithin A on Neuroinflammation in BV-2 Microglia. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 18(1):68. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010068>
- Toney AM, Fox D, Chaidez V, Ramer-Tait AE, Chung S. 2021. Immunomodulatory role of urolithin a on metabolic diseases. *Biomedicines.* 9(2):1–18.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines9020192>

Tönnies E, Trushina E. 2017. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis.* 57(4):1105–1121.

<https://doi.org/10.3233/JAD-161088>

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. 2007. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes, Obes Metab.* 9(6):813–839. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x>

Wang J, Zhang C, Zhu J, Ding J, Chen Y, Han X. 2019. Blood-brain barrier disruption and inflammation reaction in mice after chronic exposure to Microcystin-LR. *Sci Total Environ* [Internet]. 689:662–678. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.387>

Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1842(8):1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>

Wang Y, Qiu Z, Zhou B, Liu C, Ruan J, Yan Q, Liao J, Zhu F. 2015. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. 29(5):1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.008>

Wei L, Fu J, He L, Wang H, Ruan J, Li F, Wu H. 2023. Microcystin-LR-induced autophagy regulates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in grass carp ovary cells in vitro. *Toxicol Vitro* [Internet]. 87:105520.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105520>

Yamada H, Wakamori S, Hirokane T, Ikeuchi K, Matsumoto S. 2018. Structural Revisions in Natural Ellagitannins. *Molecules* [Internet]. 23(8):1901.

<https://doi.org/10.3390/molecules23081901>

Yan M, Jin H, Pan C, Hang H, Li D, Han X. 2022. Movement Disorder and Neurotoxicity Induced by Chronic Exposure to Microcystin-LR in Mice. *Mol Neurobiol* [Internet]. 59(9):5516–5531. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02919-y>

Yang X, Wu X, Hao H, He Z. 2008. Mechanisms and assessment of water eutrophication. *J Zhejiang Univ Sci B.* 9(3):197–209.

<https://doi.org/10.1631/jzus.B0710626>

- Yuan Y, Zheng S, Zeng L, Deng Z, Zhang B, Li H. 2019. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. *J Food Sci* [Internet]. 84(12):3850–3865. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14934>
- Zafrilla P, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. 2001. Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid. *J Agric Food Chem*. 49(8):3651–3655.
- Zeb A. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem*. 44(9):1–22. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
- Zhang C, Wang J, Zhu J, Chen Y, Han X. 2020. Microcystin-leucine-arginine induced neurotoxicity by initiating mitochondrial fission in hippocampal neurons. *Sci Total Environ*. 703:134702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134702>
- Zhang M, Cui S, Mao B, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, Tang X, Chen W. 2022. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet].:1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2036693>
- Zhao S, Liu Y, Wang F, Xu D, Xie P. 2018. N-acetylcysteine protects against microcystin-LR-induced endoplasmic reticulum stress and germ cell apoptosis in zebrafish testes. *Chemosphere* [Internet]. 204:463–473. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.020>
- Zhong S, Liu Y, Wang F, Wu Z, Zhao S. 2020. Microcystin-LR induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in alveolar type II epithelial cells of ICR mice in vitro. *Toxicon* [Internet]. 174:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.12.152>