

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Fernanda Carolina Telles da Silva Fróes

**EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS DE CADEIA LONGA,  
CINAMALDEÍDO OU BENZOATO DE SÓDIO EM ASTRÓCITOS**

Porto Alegre

2024

Fernanda Carolina Telles da Silva Fróes

**EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS DE CADEIA LONGA,  
CINAMALDEÍDO OU BENZOATO DE SÓDIO EM ASTRÓCITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dra. Marina Concli Leite

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Fróes, Fernanda Carolina Telles da Silva  
Efeitos de ácidos graxos saturados de cadeia longa,  
cinamaldeído ou benzoato de sódio em astrócitos /  
Fernanda Carolina Telles da Silva Fróes. -- 2024.  
145 f.  
Orientadora: Marina Concli Leite.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. astrócitos. 2. ácidos graxos saturados de cadeia  
longa. 3. cinamaldeído. 4. benzoato de sódio. I.  
Leite, Marina Concli, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilza e André,  
por me ensinarem a importância da educação e a colocar amor em tudo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nilza e André, pelo amor incondicional, por me incentivarem a buscar meus objetivos e por me ensinarem a dar o meu melhor sempre.

Aos meus irmãos, Henrique, Diana, Bernardo e Giovanna, por serem as melhores pessoas do mundo e por estarem comigo incondicionalmente desde sempre.

Às minhas avós Diana Maria e Maria Nilza, por todo carinho e amor. A toda minha família pelo amor e alegrias divididos.

Ao Thierry, pelo amor e compreensão, por escolher dividir a vida comigo e tornar os momentos difíceis mais leves. A toda sua família, que se tornou uma extensão da minha, especialmente, Adriana e Emílio, pelo carinho e incentivo.

Aos amigos e amigas que tive sorte de cultivar. Especialmente, à Adriana Conzatti, por ser mais que uma amiga, ser uma certeza na vida. Obrigada por estar sempre comigo.

Ao Jéfeli por trabalhar comigo nesse projeto desde o início e por todo aprendizado que tivemos juntos. Tenho muito orgulho de ti. Aos demais alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório durante esses anos, a ajuda e dedicação de vocês foi essencial para a execução desse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório 31, que tenho a alegria de poder chamar de amigos, Gabriel, Jéssica Souza, Jéssica Taday e Marina Seady. Trabalhar ao lado de vocês tornou tudo mais fácil e o apoio de vocês foi imprescindível para a realização e desse trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 31A e 33 pela convivência e aprendizado, principalmente à Larissa e Adriana, pela amizade e convívio de tantos anos. À Carollina, Fabiana e Maria, por me ensinarem a trabalhar no laboratório, pela paciência, carinho e amizade.

Ao professor Carlos Alberto, que é uma inspiração como pessoa e pesquisador, pelos ensinamentos, apoio e disponibilidade sem os quais não seria possível a execução desse projeto.

À minha orientadora e amiga Marina Leite, por estar comigo e me guiar na trajetória do TCC à tese. Por todas as oportunidades de crescimento, aprendizado e pela confiança. Te admiro muito pela pessoa e profissional que tu és. Obrigada por estar comigo durante tantos anos e possibilitar a execução desse trabalho.

À UFRGS e ao PPG Bioquímica por me permitirem realizar esse trabalho e pelo ensino de excelência. Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, CAPES, FAPERGS e INCTEN.

A todos vocês o meu muito obrigada.

## FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN).

“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”

J. R. R. Tolkien

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1. ASTRÓCITOS .....	8
1.2. CONDIÇÕES QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	13
1.2.1. Neuroinflamação.....	14
1.2.2. Estresse oxidativo .....	17
1.2.3. Glicação.....	20
1.3. COMPOSTOS PROVENIENTES DA CANELA COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA.....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>PARTE II</b> .....	33
<b>CAPÍTULO I</b> .....	34
<b>CAPÍTULO II</b> .....	60
<b>CAPÍTULO III</b> .....	73
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	74
4.1. ANIMAIS .....	74
4.2. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS.....	74
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	75
4.3.1. Modelo experimental 1: efeitos do cinamaldeído ou do NaB em astrócitos e escolha das concentrações para os demais modelos .....	75
4.3.2. Modelo experimental 2: efeitos do cinamaldeído ou do NaB frente a insulto induzido por LPS em astrócitos.....	76
4.3.3. Modelo experimental 3: efeitos do cinamaldeído ou do NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio em astrócitos.....	76
4.3.4. Modelo experimental 4: efeitos do cinamaldeído ou do NaB frente a insulto induzido por metilglioxal em astrócitos.....	77
4.4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	78

4.4.1.	Atividade extracelular de LDH.....	78
4.4.2.	Incorporação de iodeto de propídio .....	78
4.4.3.	Captação de glutamato .....	79
4.4.4.	Atividade da enzima glutamina sintetase .....	80
4.4.5.	Captação de glicose.....	80
4.4.6.	Análise estatística .....	81
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>82</b>
5.1.	COMPARAÇÃO ENTRE BASAL E VEÍCULO .....	82
5.2.	MODELO EXPERIMENTAL 1: EFEITOS DO CINAMALDEÍDO OU DO NaB EM ASTRÓCITOS E ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES PARA OS DEMAIS MODELOS .....	83
5.2.1.	Efeitos do cinamaldeído ou do NaB sobre a viabilidade celular em astrócitos .....	83
5.2.2.	Efeitos do cinamaldeído ou do NaB sobre o metabolismo de glutamato e a captação de glicose em astrócitos .....	85
5.2.3.	Efeitos do cinamaldeído ou do NaB sobre a secreção e o conteúdo de S100B e o conteúdo de GFAP em astrócitos.....	88
5.2.4.	Escolha das concentrações para os demais modelos experimentais .....	91
5.3.	MODELO EXPERIMENTAL 2: EFEITOS DO CINAMALDEÍDO OU DO NaB FRENTE A INSULTO INDUZIDO POR LPS EM ASTRÓCITOS .....	91
5.3.1.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por LPS sobre a viabilidade celular em astrócitos.....	91
5.3.2.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por LPS sobre a secreção de TNF- $\alpha$ em astrócitos.....	92
5.4.	MODELO EXPERIMENTAL 3: EFEITOS DO CINAMALDEÍDO OU DO NaB FRENTE A INSULTO INDUZIDO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM ASTRÓCITOS .....	93
5.4.1.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular em astrócitos.....	93
5.4.2.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio sobre o metabolismo de glutamato em astrócitos .....	95
5.5.	MODELO EXPERIMENTAL 4: EFEITOS DO CINAMALDEÍDO OU DO NaB FRENTE A INSULTO INDUZIDO POR METILGLIOXAL EM ASTRÓCITOS .....	97
5.5.1.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por metilglioxal sobre a viabilidade celular em astrócitos.....	97
5.5.2.	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por metilglioxal sobre a captação de glicose e a secreção e o conteúdo de S100B em astrócitos .....	98
<b>6.</b>	<b>RESUMO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
	<b>PARTE III.....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>118</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>120</b>

9.1. PARA FINALIZAR O ARTIGO DO CAPÍTULO I.....	120
9.2. PARA FINALIZAR OS DADOS DO CAPÍTULO III .....	120
REFERÊNCIAS .....	122
ANEXOS.....	135
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA NÚMERO 27570 .....	136
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA NÚMERO CEUA 32774.....	137
ANEXO C – LISTA DE FIGURAS .....	138
ANEXO D – LISTA DE TABELAS .....	139

## **PARTE I**

## RESUMO

Os astrócitos são células com funções essenciais para a homeostase do sistema nervoso central capazes de detectar e responder a insultos centrais e periféricos. Disfunções astrocíticas podem resultar em distúrbios como as doenças neurodegenerativas, que agem em vias inflamatórias, de estresse oxidativo e de glicação. Além disso, é sugerido que desequilíbrios no metabolismo e nas concentrações dos ácidos graxos saturados de cadeia longa poderiam estimular o início e a progressão de distúrbios cerebrais. Dentre as estratégias neuroprotetoras, um composto proveniente da canela, o cinamaldeído e seu metabólito benzoato de sódio (NaB) têm se destacado, porém suas ações nos astrócitos permanecem pouco investigadas. Dessa forma, um dos nossos objetivos foi revisar a literatura sobre os efeitos inflamatórios dos ácidos graxos saturados de cadeia longa nos astrócitos. Também, tivemos como objetivo verificar se as funções dos astrócitos são alteradas pela adição de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Além disso, analisamos se o cinamaldeído ou o NaB seriam alternativas interessantes para o tratamento das doenças neurodegenerativas. Para avaliar os efeitos dos ácidos graxos saturados de cadeia longa nos astrócitos, foram utilizadas culturas primárias incubadas com 25 a 100  $\mu\text{M}$  de ácido mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico por 24 horas. Observamos um aumento na secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) nas células incubadas com todos ácidos graxos saturados, porém apenas o ácido palmítico aumentou a secreção de S100B. O ácido palmítico também estimulou a translocação nuclear do fator nuclear kappa B. Para analisar os efeitos dos compostos provenientes da canela nas culturas primárias de astrócitos, as células foram incubadas com 50 a 200  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído ou 100 a 500  $\mu\text{M}$  de NaB por 24 horas. O cinamaldeído ou o NaB não causaram alterações na redução de MTT, na incorporação do corante vermelho neutro ou iodeto de propídio, porém 200  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído aumentou a atividade extracelular da enzima lactato desidrogenase (LDH). A incubação de cinamaldeído ocasionou um aumento dependente da dose no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e todas as concentrações diminuíram a captação de glicose. Enquanto isso, 100  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído diminuiu a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) e aumentou o conteúdo de proteína glial fibrilar ácida; 200  $\mu\text{M}$  desse composto diminuiu a secreção de S100B e a captação de glutamato. Em relação ao NaB, a concentração de 250  $\mu\text{M}$  aumentou a atividade de GS e 100  $\mu\text{M}$  aumentou o imunoc conteúdo de GSH. Em uma etapa seguinte, os astrócitos foram pré-incubados com 100  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído ou 250  $\mu\text{M}$  de NaB para verificar uma possível proteção perante diferentes insultos que mimetizam condições observadas em doenças neurodegenerativas. Para o insulto inflamatório com lipopolissacarídeo, tanto o cinamaldeído quanto o NaB preveniram o aumento na secreção de TNF- $\alpha$ . O insulto oxidante com peróxido de hidrogênio causou um aumento na atividade extracelular de LDH que foi evitado pela exposição ao cinamaldeído. Além disso, a diminuição na atividade de GS ocasionada pelo peróxido de hidrogênio foi prevenida pela incubação de cinamaldeído ou NaB. O insulto glicante com metilglioxal ocasionou um aumento na captação de glicose e uma diminuição na secreção de S100B, sendo ambos prevenidos pela incubação de cinamaldeído ou NaB. Dessa forma, pode-se concluir que os ácidos graxos saturados de cadeia longa afetam a homeostase astrocítica e, assim, podem contribuir para o processo neuroinflamatório observado em doenças neurodegenerativas. Além disso, podemos verificar que principalmente o cinamaldeído, mas também o NaB, modulam funções astrocíticas *per se* e frente a diferentes insultos, mostrando potencial para agir em vias envolvidas nas doenças neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Astrocytes are cells with essential functions for the central nervous system homeostasis, capable of detecting and responding to central and peripheral insults. Dysfunctions on astrocytes can result in disorders such as neurodegenerative diseases, which act on inflammatory, oxidative stress, and glycation pathways. Furthermore, it is suggested that imbalances in metabolism and concentrations of long-chain saturated fatty acids could stimulate the onset and progression of brain disorders. Among the neuroprotective strategies, a cinnamon compound, cinnamaldehyde and its metabolite sodium benzoate (NaB) have been highlighted, but their action on astrocytes remains poorly understood. Therefore, one of our objectives was to review the literature on the inflammatory effects of long-chain saturated fatty acids on astrocytes. We also aimed to verify whether long-chain saturated fatty acids alter astrocyte functions. Furthermore, we analyzed whether cinnamaldehyde or NaB would be interesting alternatives for neurodegenerative diseases treatment. To evaluate the effects of long-chain saturated fatty acids on astrocytes, primary cultures were incubated with 25 to 100  $\mu\text{M}$  of myristic, stearic, palmitic, linoleic, or linolenic acids for 24 hours. We observed an increase in tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) secretion in cells incubated with all saturated fatty acids, but only palmitic acid increased S100B secretion. Palmitic acid also stimulated nuclear translocation of nuclear factor kappa B. To analyze the effects of cinnamon-derived compounds on astrocyte primary cultures, cells were incubated with 50 to 200  $\mu\text{M}$  of cinnamaldehyde or 100 to 500  $\mu\text{M}$  of NaB for 24 hours. Cinnamaldehyde or NaB did not alter MTT reduction, neutral red dye, or propidium iodide incorporation, however, 200  $\mu\text{M}$  cinnamaldehyde increased the extracellular activity of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. Cinnamaldehyde incubation increased the reduced glutathione (GSH) content in a dose-dependent manner, and all concentrations decreased glucose uptake. Meanwhile, 100  $\mu\text{M}$  cinnamaldehyde decreased glutamine synthetase (GS) enzyme activity and increased glial fibrillary acidic protein content; 200  $\mu\text{M}$  of this compound decreased S100B secretion and glutamate uptake. Regarding NaB, the concentration of 250  $\mu\text{M}$  increased GS activity and 100  $\mu\text{M}$  increased GSH immunocontent. In the next step, astrocytes were pre-incubated with 100  $\mu\text{M}$  cinnamaldehyde or 250  $\mu\text{M}$  NaB to verify possible protection against different insults that mimic conditions observed in neurodegenerative diseases. For the inflammatory insult with lipopolysaccharide, both cinnamaldehyde and NaB prevented the increase in TNF- $\alpha$  secretion. The oxidative insult with hydrogen peroxide caused an increase in extracellular LDH activity that was prevented by exposure to cinnamaldehyde. Furthermore, the decrease in GS activity caused by hydrogen peroxide was prevented by incubating cinnamaldehyde or NaB. The glycant insult with methylglyoxal increased the glucose uptake and decreased the S100B secretion, both of which were prevented by incubation with cinnamaldehyde or NaB. Therefore, it can be concluded that long-chain saturated fatty acids affect astrocytic homeostasis and, thus, may contribute to the neuroinflammatory process observed in neurodegenerative diseases. Moreover, we noticed that mainly cinnamaldehyde, but also NaB, modulate astrocytic functions *per se* and against different insults, showing potential to act in pathways involved in neurodegenerative diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
CoA	Coenzima A
DCFH	Diclorodifluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida
GLUT	Transportador de glicose
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NaB	Benzoato de sódio
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ASTRÓCITOS

Os astrócitos são células com formato e função heterogêneos e possuem alta plasticidade adaptativa, permitindo que atuem na homeostase do sistema nervoso central. As diferentes funções dessas células são de extrema importância para todos os aspectos funcionais do sistema nervoso central do desenvolvimento ao envelhecimento (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Baseando-se em sua localização e morfologia, tradicionalmente, os astrócitos presentes na substância cinzenta foram classificados como protoplasmáticos e os encontrados na substância branca como fibrosos. Apesar dessa classificação estar correta, ela não abrange suficientemente a heterogeneidade dessas células (HASEL; LIDDELOW, 2021).

Os astrócitos dão suporte a funções essenciais do sistema nervoso central, participando da formação e maturação de sinapses, controle da homeostase de água, íons, prótons e metabólitos energéticos e agindo no combate às espécies reativas de oxigênio (EROs) (DOSSI; VASILE; ROUACH, 2018). Ainda, essas células removem e catabolizam neurotransmissores e fornecem aos neurônios precursores de neurotransmissores (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Diversas evidências indicam um papel dos astrócitos no processamento de informações e formação de memória no cérebro (DOSSI; VASILE; ROUACH, 2018). Os astrócitos também controlam a homeostase metabólica sintetizando glicogênio e fornecendo aos neurônios substratos energéticos (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

Os astrócitos emitem processos que fazem contato próximo com soma, dendritos e axônios neuronais. As células astrocíticas também possuem finos processos chamados de pés

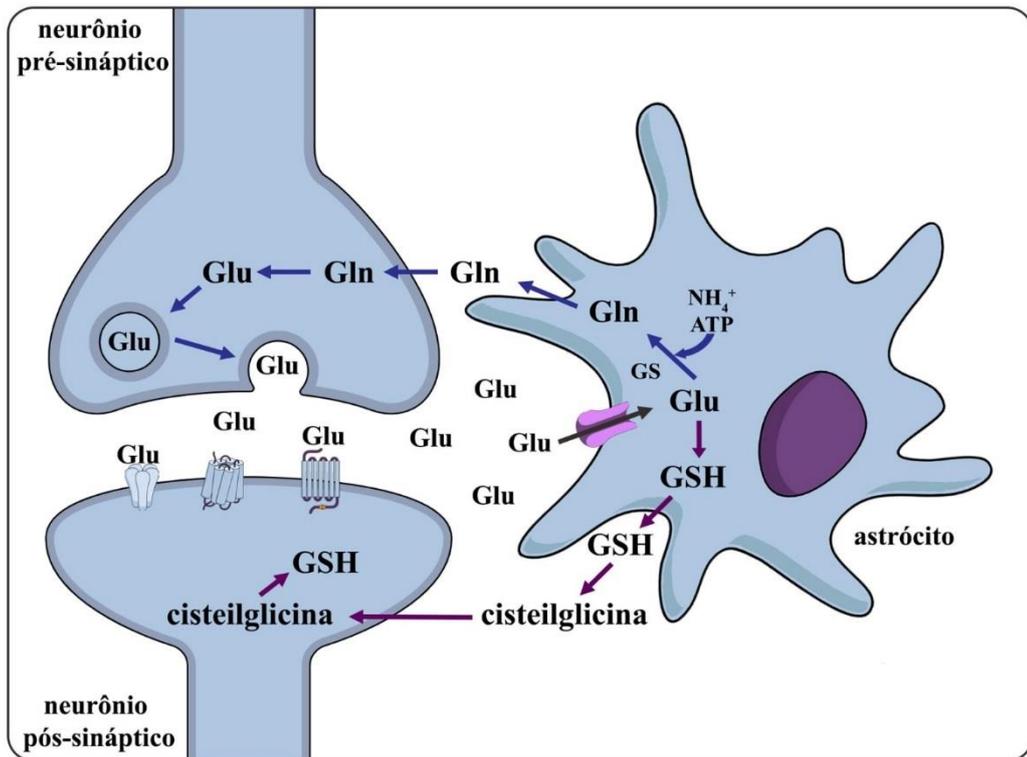
terminais, que se estendem por praticamente toda a lâmina basal da vasculatura cerebral (WEBER; BARROS, 2015). Junto a células endoteliais especializadas, pericitos e uma lâmina basal elaborada, os pés astrocíticos são parte integrante da barreira hematoencefálica, contribuindo para a absorção seletiva de nutrientes e metabólitos necessários, impedindo a entrada de substâncias tóxicas e células imunes, bem como permitindo o efluxo de produtos residuais (SCHIWECK; EICKHOLT; MURK, 2018).

Outro papel crítico dos astrócitos é no chamado ciclo glutamato-glutamina (Figura 1). As células astrocíticas permitem a continuidade da transmissão sináptica através da captação do glutamato liberado na fenda sináptica pelos neurônios. Depois de captado pelo astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintetase (GS), enzima específica da glia no sistema nervoso central, em uma reação e amidação dependente de adenosina trifosfato (ATP) (MARTINEZ-HERNANDEZ; BELL; NORENBORG, 1977, OTTERSEN; WALBERG, 1992). A glutamina é redistribuída para os neurônios para síntese de novo de glutamato para manutenção da transmissão sináptica.

O glutamato, nos astrócitos, também pode ser destinado à síntese de glutathiona reduzida (GSH), importante antioxidante cerebral. Os astrócitos são as células do sistema nervoso central mais resistentes ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de GSH. O tripeptídeo GSH, formado por glutamato, cisteína e glicina, é considerado o principal antioxidante cerebral (AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008). A GSH pode atuar diretamente na detoxificação de EROs de maneira não enzimática ou ser oxidada a glutathiona dissulfeto pela glutathiona peroxidase (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000). Os astrócitos têm um papel fundamental em relação às espécies reativas de oxigênio em todo o cérebro devido sua capacidade alta de síntese de GSH, proporcionando proteção aos neurônios. As células astrocíticas também secretam GSH que pode ser usada como substrato para a ectoenzima

astroglial  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase cujo produto, o dipeptídeo cisteilglicina, é usado como precursor para a síntese de GSH pelos neurônios (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000) (Figura 1). Além disso, a capacidade de reduzir ou sintetizar GSH é um aspecto chave para determinar o estado redox celular.

**Figura 1 – Ciclo glutamato-glutamina e metabolismo de GSH**



**Ciclo glutamato-glutamina e metabolismo de GSH.** A figura mostra o ciclo glutamato-glutamina (setas azuis), no qual o astrócito capta o excesso de glutamato (Glu) liberado na fenda sináptica pelo neurônio pré-sináptico; depois de captado, o glutamato pode ser condensado com amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) pela enzima glutamina sintetase (GS), que o converte em glutamina (Gln) em uma reação dependente de adenosina trifosfato (ATP); a glutamina pode ser redistribuída para o neurônio para síntese de novo de glutamato. No astrócito, o glutamato também pode ser destinado à síntese de glutatona reduzida (GSH) (setas roxas), tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina; o astrócito secreta GSH, que pode ser usada como substrato para a ectoenzima astroglial  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase cujo produto, o dipeptídeo cisteilglicina, é usado como precursor para a síntese de GSH pelo neurônio.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Além disso, nos astrócitos, o glutamato captado também pode estimular a glicólise e gerar lactato. O lactato pode ser exportado dos astrócitos para ser utilizado pelos neurônios

como fonte energética, um mecanismo chamado de lançadeira de lactato astrócito-neurônio (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994, DANBOLT, 2001).

O excesso de glutamato liberado na sinapse ou deficiência na remoção desse neurotransmissor resulta em excitotoxicidade, a qual pode levar à morte neuronal e, por isso, tem sido relacionada a diversas desordens neurológicas. Assim, a alteração na captação astrocítica do glutamato tem sido destacada como um aspecto central em diversos distúrbios neurodegenerativos (BLANCO-SUÁREZ; CALDWELL; ALLEN, 2017).

A S100B é uma proteína ligante de cálcio típica de astrócitos. Essa proteína é membro da família S100, que são proteínas diméricas ligantes de cálcio que agem como tampões de  $\text{Ca}^{2+}$  e transdutores para sua sinalização intracelular (DONATO et al., 2013). A S100B está presente no citoplasma de células como um homodímero no qual as duas subunidades, de aproximadamente 10,5 kDa, são mantidas unidas por ligações não-covalentes e são arrançadas de maneira antiparalela (GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008). Esta proteína pode tanto estar na forma solúvel quanto associada com membranas intracelulares, centrossomos, microtúbulos e filamentos intermediários tipo III (DONATO, 2003). No sistema nervoso central, a S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos constitutivamente e sobre estimulação com vários agentes (PINTO et al., 2000), como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e glutamato, ou estresse metabólico (DONATO et al., 2009, EDWARDS; ROBINSON, 2006). Foram descritas diversas funções intracelulares da S100B, dentre elas, participação na regulação da proliferação e diferenciação celular, na homeostase do cálcio e na modulação de processos como a fosforilação de proteínas e na atividade enzimática (DONATO, 2001, DONATO et al., 2009). Também são observados efeitos extracelulares da S100B em culturas neuronais classicamente categorizados conforme sua concentração. Em concentrações de picomolar e nanomolar, a S100B exibiria efeito trófico e em concentrações de micromolar,

efeito apoptótico, porém essa classificação não abrange a complexidade dos impactos extracelulares ocasionados por essa proteína *in vivo*. Esses efeitos extracelulares parecem envolver a ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) em diferentes tipos celulares (DONATO et al., 2009). Além disso, a S100B foi apontada como um marcador de ativação astrogliar em situações patológicas cerebrais e alterações em sua concentração no líquido cefalorraquidiano ou em seu conteúdo sérico têm sido relacionadas a doenças neurológicas e psiquiátricas (ROTHERMUNDT et al., 2003, SEN; BELLI, 2007).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é a principal proteína de filamento intermediário do citoesqueleto de astrócitos maduros, sendo característica desse tipo celular e utilizada como sua marcadora. As células astrocíticas, em situações de dano no sistema nervoso central, tornam-se reativas e este estado ativado é chamado de astrogliose (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). O aumento no imunoconteúdo de GFAP tem sido utilizado como marcador dessa astrogliose, independentemente de haver proliferação astrogliar. Deve-se atentar que, os astrócitos podem se alterar em resposta a estímulos patológicos e esse contexto deve ser diferenciado da ativação por sinais fisiológicos que participam da plasticidade de astrócitos saudáveis. Por isso, mesmo que a transição da fisiologia para a patologia possa ocorrer gradualmente e que seja difícil determiná-la, deve-se utilizar o termo “ativação de astrócitos” para situações fisiológicas e a expressão “reatividade de astrócitos” em contextos patológicos (revisado em ESCARTIN et al., 2021).

Os astrócitos também são capazes de detectar e responder rapidamente a insultos periféricos. Essas respostas podem ser produzidas em reação a insultos agudos, como infecção ou lesão, ou crônicos, como doenças crônicas e suas comorbidades (HASEL; LIDDELOW, 2021). Através dessa resposta reativa, os astrócitos, junto à microglia, representam o principal sistema de defesa do sistema nervoso central (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

## 1.2. CONDIÇÕES QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O funcionamento adequado do cérebro é essencial para a manutenção de diferentes atividades em todo o corpo. Dessa forma, diversas situações de desbalanço nesse órgão podem afetar funções em todo o organismo. Além disso, as doenças neurodegenerativas estão entre as principais causas de incapacidade e morbidade no mundo, aumentando seu impacto com o envelhecimento da população. Nessas circunstâncias, as células cerebrais vão reagir de diferentes formas, sendo os astrócitos capazes de responder a inúmeras situações que afetam a homeostase do sistema nervoso central (ZHOU; ZUO; JIANG, 2019, KWON; KOH, 2020). Um aspecto importante observado nas doenças neurodegenerativas é o aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica (DE BOER; GAILLARD, 2006), que torna o cérebro mais exposto a substâncias que não seriam permeáveis em condições fisiológicas e podem contribuir para a patologia dessas desordens.

Apesar de existirem diversos fatores envolvidos no seu desenvolvimento e progressão, muitas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla, têm a inflamação e o estresse oxidativo como seus componentes fundamentais (KANNAPPAN et al., 2011). Além disso, tem sido descrito que o processo de glicação e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) também está envolvido no acidente vascular cerebral e em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (ZHANG et al., 2021). É interessante notar que, essas características também podem ser observadas no envelhecimento e em algumas desordens psiquiátricas.

A cooperação astrócito-neurônio modula diversas funções cognitivas, controlando ativamente a plasticidade sináptica e a neurotransmissão, além da liberação de gliotransmissores que estão envolvidos na plasticidade sináptica e em processos de aprendizagem (GONZÁLEZ-REYES et al., 2017). Assim, a interrupção das funções

astrocíticas pode resultar em diferentes distúrbios, como observado nas doenças neurodegenerativas.

As doenças neurodegenerativas afetam diferentes regiões cerebrais e possuem diversas etiologias, no entanto, elas podem atuar em processos celulares e moleculares semelhantes. É importante ressaltar que, apesar do esforço aplicado para desenvolver terapias para essas doenças, ainda existem muitos desafios para o tratamento apropriado e eficaz das desordens neurodegenerativas.

#### 1.2.1. Neuroinflamação

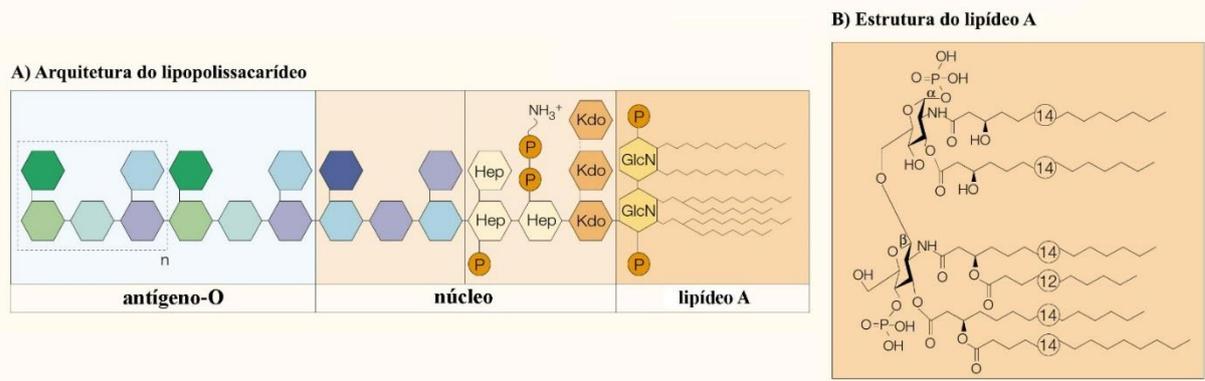
A neuroinflamação é a inflamação que ocorre no cérebro ou na medula espinhal e envolve neurônios e células gliais dentro do sistema nervoso central. A intensidade da neuroinflamação depende do contexto, da duração e do curso do estímulo inicial ou insulto (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016, ZHANG et al., 2023). Diferentes evidências demonstram que a inflamação crônica tem um papel significativo no desenvolvimento e na patogênese de diversas desordens neurológicas agudas ou crônicas como doenças neurodegenerativas, incluindo doenças de Alzheimer e de Parkinson, esclerose múltipla, tumor cerebral e meningite (KANNAPPAN et al., 2011), além de acidente vascular cerebral e depressão (HAJINEJAD et al., 2020).

Apesar de as respostas inflamatórias serem importantes e benéficas para o reparo tecidual no sistema nervoso central, a intensidade e a duração dessa inflamação vão influenciar se esses sinais inflamatórios terão consequências positivas ou negativas (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Durante o processo neuroinflamatório, células imunes e gliais são muito ativadas (HAJINEJAD et al., 2020). A ativação de microglia e astrócitos é uma característica

importante da neuroinflamação e leva à liberação de mediadores como citocinas pró-inflamatórias, desencadeando neurotoxicidade e disfunção neuronal contribuindo para o desenvolvimento das patologias neurodegenerativas (TAKATA et al., 2021). Dessa forma, tratar ou prevenir a disfunção do tecido neural mediada pela neuroinflamação pode ser de promissor benefício em desordens neurológicas.

A neuroinflamação pode ser desencadeada por substâncias endógenas ou patógenos exógenos. Essas moléculas exógenas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos, por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um potente desencadeador de inflamação e, portanto, utilizado em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* de inflamação, neuroinflamação, sepse e neurodegeneração (ZAKARIA et al., 2017, DICKSON; LEHMANN, 2019, BATISTA et al., 2019). O LPS é uma endotoxina da membrana externa de bactérias gram-negativas que é essencial para a estabilidade da sua membrana. O LPS se ancora à membrana bacteriana por até sete cadeias acila que constituem o chamado lipídio A, que é ligado a um núcleo oligossacarídico e a uma cadeia polissacarídica altamente variável denominada antígeno O (PŁÓCIENNIKOWSKA et al., 2015) (Figura 2). Evolutivamente, o lipídeo A é a parte mais conservada do LPS e é responsável por sua atividade pró-inflamatória. Em mamíferos, o LPS produz um estímulo inflamatório persistente, pois é muito resistente à degradação por enzimas (OHANIAN; SCHWAB, 1967). O LPS induz inflamação sistêmica e isso é utilizado para estudar várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (revisto em ZAKARIA et al., 2017, BATISTA et al., 2019, BROWN, 2019).

**Figura 2 – Estrutura do lipopolissacarídeo**



Fonte: Adaptado de (BEUTLER; RIETSCHER, 2003)

Algumas substâncias endógenas chamadas de padrões moleculares associados a danos também podem desencadear inflamação periférica e neuroinflamação, como por exemplo, as alarminas. Outras moléculas que têm despertado interesse nos estudos sobre inflamação são os ácidos graxos saturados, principalmente os de cadeia longa. Evidências recentes sugerem que desequilíbrios no metabolismo e nas concentrações de ácidos graxos poderiam estimular o início e a progressão de distúrbios no sistema nervoso central, como doenças de Alzheimer e Parkinson e esclerose múltipla (BOGIE et al., 2020). Além disso, o consumo de dietas com alto teor de gordura tem sido associado a inflamação no cérebro e problemas cognitivos em animais (GUILLEMOT-LEGRIS et al., 2016, PISTELL et al., 2010, JEON et al., 2012). Nesse sentido, sabe-se que a suplementação dietética com ácidos graxos saturados de cadeia longa promove neuroinflamação em diversos modelos (BOGIE et al., 2020). Pode-se destacar ainda que a obesidade induz à neuroinflamação, além de provocar disfunção cognitiva (GUILLEMOT-LEGRIS et al., 2016).

É sugerido que o excesso de nutrientes seria o gatilho para desencadear a inflamação observada em indivíduos obesos. Assim, ácidos graxos saturados da dieta ou do próprio metabolismo poderiam ser uma das causas da inflamação central e periférica observada na obesidade, já que essas moléculas podem desencadear a liberação de citocinas pró inflamatórias

no cérebro, como TNF- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (GUPTA et al., 2012), e ativar respostas imunes e inflamatórias no corpo (ROSA NETO et al., 2021). É interessante notar que a porção lipídica do LPS se assemelha estruturalmente aos ácidos graxos saturados de cadeia longa. As cadeias acila do lipídio A possuem entre 12 e 16 carbonos de comprimento. Sabe-se também que a substituição de ácido graxo saturado por monoinsaturado ou poli-insaturado impede a atividade inflamatória do LPS (FRITSCHE, 2015).

Corroborando a hipótese de que os ácidos graxos saturados podem levar a neuroinflamação, foi demonstrado que mesmo quando administrados perifericamente eles se acumulam principalmente em astrócitos (MORAND; BAUMANN; BOURRE, 1979, BERNOUD et al., 1998). Somando-se ao papel dos astrócitos na homeostase e na resposta inflamatória, além de sua função no suprimento de nutrientes derivados do sangue para os neurônios, são vários os fatores que destacam os astrócitos com um alvo fisiológico provável para a ação tóxica dos ácidos graxos saturados.

### 1.2.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é outra característica comum às doenças neurodegenerativas. Ele tem sido relacionado à etiologia das doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (ISLAM, 2017). Além disso, tem sido destacado o envolvimento do estresse oxidativo em distúrbios neuropsiquiátricos, como ansiedade e depressão (SALIM, 2017).

Os radicais livres, são moléculas muito instáveis e reativas em decorrência de possuírem um par de elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica. O oxigênio tende a formar radicais em razão de sua estrutura e seus dois elétrons desemparelhados (TELEANU et

al., 2022). Os radicais livres de oxigênio ou EROs são moléculas reativas derivadas do oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), ou que tenham tendência em gerar radicais livres, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

As EROs podem ser produzidas a partir de fontes exógenas, como radiação ionizante e fármacos, ou endógenas, como enzimas mitocondriais ou não mitocondriais (TELEANU et al., 2022). As EROs são produzidas principalmente na respiração celular por um processo onde elétrons liberados da cadeia de transporte de elétrons reagem com oxigênio ( $O_2$ ), formando o ânion superóxido. As EROs têm funções importantes para o organismo, como na sinalização celular e na defesa contra agentes infecciosos (POLI et al., 2004). No entanto, quando a quantidade de antioxidantes não contrabalança suficientemente a produção de EROs, essas espécies reativas podem ocasionar modificações oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, como lipídios, proteínas, RNA e DNA.

Assim, o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a resposta antioxidante, gerando excesso de EROs. O estresse oxidativo pode ocasionar adaptação ou dano celular. Na resposta adaptativa, as células aumentam a produção de antioxidantes para compensar a quantidade de radicais livres. Porém, quando a quantidade de EROs continua alta, a célula não consegue mais fazer essa compensação e podem ocorrer danos oxidativos às macromoléculas celulares ocasionando o comprometimento de funções biológicas essenciais. Se esse processo seguir sem reparo, esses prejuízos podem ser irreversíveis e causar a morte da célula.

As EROs são importantes para a plasticidade sináptica e formação da memória no neurodesenvolvimento (MASSAAD; KLANN, 2011). No entanto, o cérebro é muito suscetível ao dano oxidativo, pois além de seu consumo alto de oxigênio devido à elevada demanda energética, os fosfolipídeos das membranas neuronais são vulneráveis à peroxidação mediada

pelas EROs. O DNA e as proteínas cerebrais também são alvos das EROs, sendo que as proteínas oxidadas podem formar agregados citotóxicos (TELEANU et al., 2022). Portanto, o dano que o estresse oxidativo induz no cérebro pode prejudicar muitas funções, demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo com as doenças neurodegenerativas.

Assim como em diversas funções cerebrais, tem sido sugerido que os astrócitos têm um papel importante na regulação do estresse oxidativo no sistema nervoso central. As células astrocíticas são essenciais para a manutenção da homeostase redox em situações fisiológicas ou patológicas no sistema nervoso central. Por um lado, em algumas situações patológicas, os astrócitos podem liberar EROs e essas moléculas, em excesso, podem ativar células microgliais ou diretamente causar dano neuronal, além de ativar vias inflamatórias nos próprios astrócitos, interferir no transporte de glutamato e afetar a homeostase intra e extracelular (CHEN et al., 2020, ZHU et al., 2022). Por outro lado, os astrócitos protegem o cérebro dos danos que podem ser causados pelo estresse oxidativo, através de uma resposta antioxidante onde promovem decomposição e eliminação de radicais livres produzidos pelas células neurais (CHEN et al., 2020).

No sistema nervoso central, as respostas antioxidantes podem ocorrer pelos sistemas antioxidantes enzimático ou não enzimático. A resposta antioxidante enzimática abrange enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Já os sistemas antioxidantes não enzimáticos incluem substâncias redutoras, como a GSH, o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol, entre outros que são essenciais na eliminação de EROs (CHEN et al., 2020). A GSH é o principal antioxidante produzido pela glia e é importante na prevenção e controle do dano oxidativo.

As diversas funções astrocíticas são essenciais para o funcionamento adequado do sistema nervoso central e a disfunção dessas células pode ocasionar e promover distúrbios

neurológicos. Tendo em vista o papel fundamental dos astrócitos na produção de antioxidantes e na detoxificação de EROs e a participação dessas espécies no desenvolvimento de patologias cerebrais, o estresse oxidativo astrocítico é um provável mediador na etiologia ou manutenção de diversas doenças neurodegenerativas.

O peróxido de hidrogênio pode causar estresse oxidativo diretamente, mas também pode penetrar membranas biológicas e amplificar a formação de outras EROs. Diante disso, essa molécula é muito utilizada em estudos sobre estresse oxidativo em diferentes modelos. Além disso, o peróxido de hidrogênio também pode causar toxicidade oxidativa em astrócitos e diminuir os níveis de GSH (RAMALINGAM; KIM, 2014). Pelos citados motivos, o peróxido de hidrogênio pode interferir em vias de sinalização astrocíticas, acarretando em comprometimento de funções essenciais e dessa maneira contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas.

### 1.2.3. Glicação

As doenças neurodegenerativas também tem sido relacionadas ao processo de glicação e ao conteúdo de AGEs. O desequilíbrio no metabolismo da glicose danifica as células cerebrais (MOMTAZ et al., 2018) e muitos dos efeitos tóxicos ocasionados pelo excesso de glicose são mediados por reações de glicação. A formação de AGEs ocasiona danos irreversíveis a macromoléculas, afetando sua integridade estrutural e funcional (BROWNLEE, 2005), contribuindo para distúrbios associados ao envelhecimento. Além disso, concentrações elevadas de AGEs na circulação e no cérebro têm sido associadas à disfunção cognitiva (BEERI et al., 2011). Os AGEs se acumulam de maneira relacionada à idade no sistema nervoso central em indivíduos com doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (PAMPLONA et al., 2008, URIBARRI et al., 2015), doenças

neuropsiquiátricas (YAMASHITA et al., 2020) e neuroinflamatórias (WETZELS et al., 2019), além de aumentarem no próprio envelhecimento fisiológico (SHEN et al., 2020).

A glicação é uma modificação irreversível pós-traducional de macromoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que pode afetar suas estruturas e funções. Esse processo ocorre através de uma série de reações não enzimáticas chamada de reação de Maillard (SHEN et al., 2020). A glicação é uma reação que ocorre entre açúcares redutores livres, como a glicose, e grupos amino livres de macromoléculas, que formam compostos instáveis denominados bases de Schiff. Essas bases de Schiff originam os produtos de Amadori que são cetoaminas estáveis que podem gerar compostos dicarbonilas (glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona) através de reações de desidratação e oxidação (SHEN et al., 2020). Esses compostos dicarbonilas são muito mais reativos que os açúcares dos quais derivam, portanto, eles atuam propagando as reações de glicação. Esses propagadores reagem com grupos amino livres formando os AGEs que são compostos irreversíveis e insolúveis.

Os AGEs estão associados ao estresse oxidativo e à inflamação, processos também relacionados às doenças crônicas e neurodegenerativas (URIBARRI et al., 2015). Além disso, assim como os AGEs podem causar estresse oxidativo, o estresse oxidativo também acarreta na formação de AGEs (VLASSARA; URIBARRI, 2014).

É interessante notar que, o diabetes mellitus ocasiona comprometimento cognitivo e foi estabelecido como fator de risco para várias doenças neurodegenerativas (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016), principalmente a doença de Alzheimer. A relação entre esses dois distúrbios parece estar estabelecida, a tal ponto que, recentemente, a doença de Alzheimer tem sido considerada como um tipo de diabetes mellitus sendo chamada de “diabetes mellitus tipo 3” ou classificada como “diabetes mellitus cerebral” (KRONER, 2009). Sabe-se também que, na doença de Alzheimer, a glicação do peptídeo  $\beta$ -amilóide aumenta sua

toxicidade e contribui para a neurodegeneração (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). Nesse contexto, muitas das complicações do diabetes têm sido associadas à hiperglicemia e às altas concentrações de compostos reativos como o metilglioxal e os AGEs (BROWNLEE, 2001), que parecem ser um elo essencial entre diabetes e doença de Alzheimer (SRIKANTH et al., 2011, TOTH; MARTINEZ; ZOCHODNE, 2007, PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017).

Cabe ressaltar que, muitas proteínas associadas a doenças neurodegenerativas têm meia vida longa e, em vista disso, constituem alvos preferenciais para glicação (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). A glicação pode ter um papel importante em doenças como Alzheimer e Parkinson, possivelmente modulando a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, peptídeo  $\beta$ -amilóide e tau, além de causar efeitos danosos em outras vias comuns nos dois distúrbios (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). Nesse caso, a hiperglicemia poderia ter uma participação importante no desenvolvimento dessas doenças induzindo a glicação de proteínas e, assim, ocasionando sua disfunção, agregação e deposição (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016).

O metilglioxal é um composto dicarbonila altamente reativo com origem exógena ou fisiologicamente produzido por reações enzimáticas e não enzimáticas, com elevada produção em condições de hiperglicemia (LEE et al., 2009). A formação e acúmulo de metilglioxal têm sido implicadas na patogênese do diabetes mellitus tipo 2 e comorbidades associadas e em distúrbios do sistema nervoso central (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Esse composto pode levar à citotoxicidade, principalmente relacionada à formação de AGEs altamente oxidativos (URIBARRI et al., 2010).

O metilglioxal está presente em diversos produtos consumidos diariamente, como alimentos e bebidas, além da fumaça do cigarro. No entanto, as fontes exógenas de metilglioxal

não parecem influenciar sua concentração plasmática, já que o metilglioxal presente em alimentos é metabolizado ou reage com proteínas antes da absorção intestinal (DEGEN et al., 2013). Isso difere dos AGEs dos alimentos e bebidas, que afetam significativamente suas concentrações plasmáticas e contribuem para o *pool* de AGEs corporal, participando de seus efeitos deletérios (WEST et al., 2014).

O metilglioxal é gerado endogenamente principalmente como um subproduto da glicólise a partir das trioses-fosfato instáveis intermediárias, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3 fosfato, através da eliminação não enzimática do grupo fosfato ou pela ação da triose fosfato-isomerase de maneira irreversível (POMPLIANO; PEYMAN; KNOWLES, 1990, PHILLIPS; THORNALLEY, 1993, RICHARD, 1993). Essa via não enzimática de geração de metilglioxal acontece em todas as células e organismos (PHILLIPS; THORNALLEY, 1993), em condições fisiológicas ou patológicas. Fisiologicamente, a formação de metilglioxal constitui 0,1% do fluxo de glicotrioses (THORNALLEY, 1988). Porém, a geração de metilglioxal aumenta com o metabolismo da glicose, como no diabetes, e em vias metabólicas, como a gliconeogênese e a gliceroneogênese, associadas ao aumento nas concentrações das trioses-fosfato (AHMED et al., 2003). Além disso, condições que aumentam a glicólise, como inflamação e hipóxia, também determinam a quantidade de formação de metilglioxal (HAIK; LO; THORNALLEY, 1994).

Em menor proporção, o metilglioxal também pode ser formado no meio intracelular pela oxidação da aminoacetona no catabolismo do aminoácido L-treonina em situações de baixa disponibilidade de coenzima A (CoA), pela oxidação de corpos cetônicos catalisada pela mieloperoxidase e pelo metabolismo da acetona pela enzima citocromo P450 (THORNALLEY, 1993, VANDER JAGT; HUNSAKER, 2003, VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). Além disso, o metilglioxal pode ser gerado pela reação de Maillard através

da lenta degradação de maneira não enzimática da glicose e dos produtos de Amadori (THORNALLEY; LANGBORG; MINHAS, 1999). O metilglioxal também pode ser formado pelo acetol na presença de íons de cobre e pela peroxidação lipídica (NEMET; VARGA-DEFTERDAROVIC; TURK, 2006).

Em circunstâncias fisiológicas, o metilglioxal é catabolizado principalmente pelo sistema glioxalase, através da ação das enzimas glioxalase 1 e glioxalase 2, em uma via dependente de GSH e aldose redutase dependente de NADPH (VICENTE MIRANDA; EL-AGNAF; OUTEIRO, 2016). O metilglioxal é altamente reativo e o agente glicante mais potente em humanos (GLOMB; MONNIER, 1995), sendo o principal responsável pela glicação não enzimática de proteínas e DNA, formando AGEs (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). O metilglioxal e seus AGEs derivados podem afetar funções e estrutura de proteínas, danificando células, órgãos e tecidos (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

O metilglioxal é até 50000 vezes mais reativo que a glicose em relação à glicação, mesmo que sua concentração plasmática seja cerca de 25000 vezes menor (THORNALLEY, 2005). Assim, o metilglioxal gera mais rapidamente adutos de glicação podendo modificar a função de proteínas intra e extracelulares, lipídios e DNA. Dessa forma, o metilglioxal tem sido utilizado em modelos de estudos relacionados a condições glicantes.

### 1.3. COMPOSTOS PROVENIENTES DA CANELA COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA

Dentre as estratégias neuroprotetoras estudadas recentemente, os compostos bioativos provenientes de plantas têm se destacado e suas potenciais propriedades têm sido investigadas. Porém, devido à variedade e à quantidade dessas moléculas, algumas ainda permanecem pouco

exploradas. Dentre esses compostos, destacam-se os provenientes da canela, pois efeitos protetores promissores têm sido observados no diabetes mellitus e em vias pró-inflamatórias e de estresse oxidativo em estudos com a canela e seus derivados (MOMTAZ et al., 2018). No entanto, os compostos isolados específicos e os mecanismos envolvidos permanecem pouco explorados no sistema nervoso central e são ainda menos estudados em células gliais.

A canela é nativa do Sri Lanka e do sul da Índia e é uma especiaria amplamente utilizada ao redor do mundo. Essa planta e seu óleo essencial são usados como tempero na culinária, como agente aromatizante e na indústria em balas, gomas de mascar e itens de higiene bucal. Além disso, medicinas tradicionais, como a chinesa e a indiana, têm feito amplo uso da canela para tratar diversas condições como flatulência, irregularidades menstruais, diarreia, febre e dor de cabeça (BANDARA; ULUWADUGE; JANSZ, 2012, HAJIMONFAREDNEJAD et al., 2019).

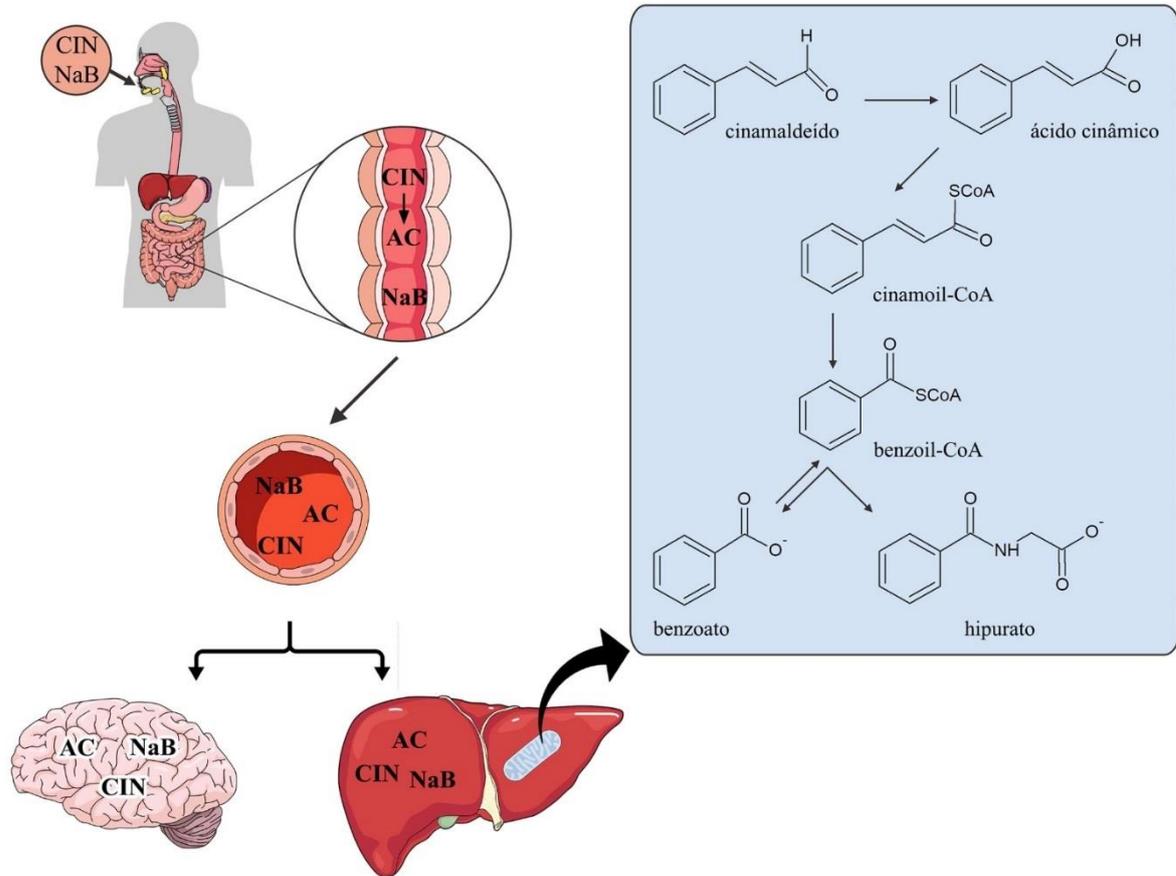
A canela é obtida da casca interna de árvores pertencentes ao gênero *Cinnamomum*, que são consideradas plantas tropicais perenes. Da família Lauraceae, o gênero *Cinnamomum* contém mais de 250 espécies de árvores e arbustos com duas variedades principais, *Cinnamomum verum* ou *zeylanicum*, também chamada de canela verdadeira e *Cinnamomum cassia* ou *aromaticum*, também conhecida como canela chinesa (RANASINGHE et al., 2013). Os principais componentes da canela são o eugenol nas folhas, a cânfora nas raízes e o cinamaldeído na casca (RAO; GAN, 2014).

O cinamaldeído é o principal composto ativo da canela, compreendendo de 65% a 80% dos constituintes químicos da sua casca (RAO; GAN, 2014) e conferindo o odor e o sabor característico dessa especiaria. Muitas das propriedades benéficas da canela em diferentes situações patológicas têm sido atribuídas a esse composto. Propriedades antioxidantes (CHOI, 2020), anti-inflamatórias (GULEC PEKER; KALTALIOGLU, 2021), antiobesidade (ZUO et

al., 2017, ÇELIK et al., 2022) e antidiabéticas (SUBASH BABU; PRABUSEENIVASAN; IGNACIMUTHU, 2007, JAWALE et al., 2016) foram conferidas ao cinamaldeído.

Depois de ingerido, o cinamaldeído é bem distribuído por todo o corpo após a absorção (ZHU et al., 2017). Esse composto bioativo tem uma meia-vida de 6,7 horas e é estável no plasma de ratos por 24 horas após a administração oral (ZHAO et al., 2014, MOMTAZ et al., 2018). O cinamaldeído é oxidado parcialmente a ácido cinâmico no estômago e no intestino delgado e, no fígado, quase totalmente metabolizado nessa molécula (CHEN; MA; MA, 2009, ZHU et al., 2017). No fígado, o ácido cinâmico forma cinamoil-CoA que é  $\beta$ -oxidado na mitocôndria formando benzoil-CoA, que pode ser liberado na forma de benzoato de sódio (NaB) (KHASNAVIS; PAHAN, 2012). No fígado e nos rins, o benzoil-CoA pode ser conjugado com a glicina formando hipurato, numa reação em dois passos que ocorre na matriz mitocondrial (LENNERZ et al., 2015). No caso da ingestão direta do NaB, ao entrar na matriz mitocondrial, o benzoato é convertido a benzoil-CoA por uma enzima ligase ácido:CoA dependente de ATP; depois o benzoil-CoA é convertido em hipurato, com a conjugação à glicina, pela glicina N-aciltransferase que sai da mitocôndria. O ácido hipúrico é excretado pela urina e é a principal forma de excreção dos intermediários do metabolismo do cinamaldeído (COCCHIARA et al., 2005) (Figura 3). Nenhum metabólito tóxico ou persistente é formado (SHREAZ et al., 2016). Foi demonstrado que a administração oral do pó de canela aumenta a concentração de NaB no soro e no cérebro de ratos, por consequência ele também tem sido utilizado para estudar as propriedades da canela (JANA et al., 2013, KHASNAVIS; PAHAN, 2014, MODI et al., 2015b).

**Figura 3 – Metabolização do cinamaldeído e do NaB**



**Metabolização do cinamaldeído e do NaB.** Depois de ingeridos, o cinamaldeído (CIN) e o benzoato de sódio (NaB) são bem distribuídos pelo corpo, incluindo o cérebro. O cinamaldeído é oxidado parcialmente a ácido cinâmico (AC) no estômago e no intestino delgado e, no fígado, quase completamente metabolizado nessa molécula. Nas mitocôndrias hepáticas, o ácido cinâmico forma cinamoil-CoA que é β-oxidado formando benzoil-CoA, que pode ser liberado na forma de benzoato ou pode ser conjugado com a glicina formando hipurato, principal metabólito excretado. O NaB ingerido, ao entrar na matriz mitocondrial, é convertido a benzoil-CoA, podendo ser então convertido a hipurato.

Fonte: Elaborado pelos autores

Alguns trabalhos têm mostrado efeitos interessantes do NaB em diferentes situações. Dentre esses, pode-se destacar efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Além disso, alguns estudos têm indicado seu potencial benefício em diferentes desordens neurológicas tais como, doença de Alzheimer (MODI et al., 2015a) e Parkinson (RANGASAMY et al., 2021a), esclerose múltipla (MODI et al., 2015b) e traumatismo craniano (RANGASAMY et al., 2021b). É interessante notar que, estudos utilizando NaB em astrócitos observaram aumento de fator neurotrófico derivado do cérebro, de neurotrofina-3 (JANA et al., 2013), da proteína protetora

da doença de Parkinson, DJ-1 (KHASNAVIS; PAHAN, 2012) e do fator neurotrófico ciliar, de importância na esclerose múltipla (MODI et al., 2015b).

A segurança e toxicidade da canela não causam preocupação. De acordo com a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) a canela é categorizada como “geralmente reconhecido como segura” como aditivo alimentar (MOMTAZ et al., 2018). Assim como o cinamaldeído, que é considerado um agente natural seguro para humanos e animais pelo FDA e pelo Conselho Europeu, com uma ingestão diária aceitável de 1,25 mg/kg peso corporal (ZHU et al., 2017, MOMTAZ et al., 2018). O NaB também não é tóxico e foi observado que uma solução 2% de NaB na água foi segura para administração ao longo da vida de camundongos, sem efeitos colaterais visíveis (TOTH, 1984). O NaB também possui a classificação “geralmente reconhecido como seguro” de acordo com o FDA (“CFR - Code of Federal Regulations Title 21”) e o limite permitido para seu consumo é de até 5 mg/Kg de peso corporal (WALCZAK-NOWICKA; HERBET, 2022). Além disso, o NaB é aprovado pelo FDA para uso no tratamento de defeitos metabólicos hepáticos associados à hiperamonemia, como desordens no ciclo da ureia em crianças (GROPMAN; SUMMAR; LEONARD, 2007), bem como para o uso como conservante alimentar (NAIR, 2001) por suas atividades antibacterianas e antifúngicas.

Apesar disso, é importante ressaltar que as espécies mais comuns de canela (*Cinnamomum verum* e *Cinnamomum cassia*) contém diferentes quantidades de cumarina. As cumarinas são compostos de origem natural com propriedades anticoagulantes, carcinogênicas e hepatotóxicas (RANASINGHE et al., 2012). Enquanto as quantidades de cumarina são apenas vestigiais no *Cinnamomum verum*, o *Cinnamomum cassia* contém concentrações consideradas altas e que podem representar algum risco à saúde se for consumido regularmente em grandes quantidades (RANASINGHE et al., 2012). Segundo o Instituto Federal Alemão para Avaliação

de Risco (BfR), 1 kg de *Cinnamomum cassia* em pó contém entre 2,1 g e 4,4 g de cumarina, o que quer dizer que uma colher de chá de canela chinesa em pó teria de 5,8 mg a 12,1 mg de cumarina (GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT, 2006), (RANASINGHE et al., 2013); para a maior parte das pessoas essa quantidade está acima da ingestão diária tolerável de cumarina, que é 0,1 mg/kg de peso corporal/dia recomendada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (ABRAHAM et al., 2010, RANASINGHE et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido ao envelhecimento da população, as doenças neurodegenerativas têm se tornado uma preocupação de saúde pública. Muitas dessas doenças afetam e agem em vias e mecanismos semelhantes, entre eles, a inflamação, o estresse oxidativo e o processo de glicação e formação de AGEs. É importante ressaltar que os ácidos graxos saturados, principalmente os de cadeia longa, podem estar envolvidos em mecanismos de indução e manutenção das doenças neurodegenerativas, no entanto, esse processo não é inteiramente compreendido. Além disso, sabe-se que a função e a resposta dos astrócitos são aspectos relevantes para o desenvolvimento e manutenção das desordens neurodegenerativas.

Por outro lado, os mecanismos das doenças neurodegenerativas não são completamente compreendidos, bem como, ainda são investigadas opções de tratamentos eficazes. Dessa forma, o cinamaldeído, composto proveniente da canela, e seu metabólito NaB tem sido estudados para o tratamento de diferentes doenças centrais e periféricas, porém seus efeitos nos astrócitos permanecem pouco explorados.

Portanto, é importante analisar se a função dos astrócitos é afetada pela ação de ácidos graxos saturados de cadeia longa, bem como revisar a literatura disponível sobre o tema. Da mesma forma, é relevante verificar se o cinamaldeído ou o NaB modulam a função dos astrócitos *per se* e frente a situações de insultos que mimetizam características comuns a diversas doenças neurodegenerativas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Examinar a literatura sobre a participação dos astrócitos na neuroinflamação induzida por ácidos graxos saturados de cadeia longa. Também, analisar o efeito da incubação de ácidos graxos saturados de cadeia longa em culturas primárias de astrócitos sobre parâmetros inflamatórios e de estado redox. Além disso, avaliar o efeito da exposição de culturas primárias de astrócitos ao cinamaldeído ou ao NaB sobre parâmetros funcionais característicos desse tipo celular, bem como verificar sua ação frente a insultos inflamatório, oxidante ou glicante.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Investigar na literatura o papel dos astrócitos na neuroinflamação induzida por ácidos graxos saturados de cadeia longa.
- 3.2.2. Verificar os efeitos dos ácidos mirístico, palmítico, esteárico, linoleico ou linolênico em concentrações de 25 a 100  $\mu\text{M}$  incubados por 24 horas em cultura primária de astrócitos sobre a secreção de TNF- $\alpha$  e S100B, a viabilidade celular e o estado redox.
- 3.2.3. Avaliar os efeitos da incubação de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído ou 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$  de NaB por 24 horas em cultura primária de astrócitos sobre viabilidade e integridade celular, metabolismo de glutamato, captação de glicose e parâmetros característicos de astrócitos. Com base nos resultados obtidos, escolher uma concentração para o cinamaldeído e uma para o NaB para serem utilizadas nos modelos seguintes do trabalho.

- 3.2.4. Analisar o efeito da pré-incubação de cinamaldeído ou de NaB e posterior incubação de LPS em culturas primárias de astrócitos sobre viabilidade e integridade celular e secreção de TNF- $\alpha$ .
- 3.2.5. Verificar o efeito da pré-incubação de cinamaldeído ou de NaB e posterior incubação de peróxido de hidrogênio em culturas primárias de astrócitos sobre viabilidade e integridade celular e metabolismo de glutamato.
- 3.2.6. Avaliar o efeito da pré-incubação de cinamaldeído ou de NaB e posterior incubação de metilglioxal em culturas primárias de astrócitos sobre viabilidade e integridade celular, captação de glicose e secreção e imunoconteúdo de S100B.

## **PARTE II**

## **CAPÍTULO I**

**Role of astrocytes in neuroinflammation induced by long-chain saturated fatty acids**

Artigo em preparação para submissão no periódico *Nutritional Neuroscience*

## **CAPÍTULO II**

Palmitic acid, but not other long-chain saturated fatty acids, increases S100B protein and  
TNF- $\alpha$  secretion by astrocytes

Artigo aceito para publicação no periódico *Nutrition Research*

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/NTR](http://www.elsevier.com/locate/NTR)

## Original Research

# Palmitic acid, but not other long-chain saturated fatty acids, increases S100B protein and TNF- $\alpha$ secretion by astrocytes

Fernanda Telles Fróes<sup>a</sup>, Carollina Da Ré<sup>a</sup>, Jéssica Taday<sup>a</sup>, Fabiana Galland<sup>b</sup>,  
Carlos Alberto Gonçalves<sup>a</sup>, Marina Concli Leite<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup>Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 July 2023

Revised 18 December 2023

Accepted 19 December 2023

## Keywords:

Long-chain fatty acid

Palmitic acid

Astrocyte

S100 calcium-binding protein B

Inflammation

## ABSTRACT

Obesity is a health problem that involves fat accumulation in adipose and other tissues and causes cell dysfunction. Long-chain saturated fatty acids can induce and propagate inflammation, which may also contribute to the brain alterations found in individuals with obesity. Fatty acids accumulate in astrocytes in situations of blood–brain barrier disruption, such as inflammatory conditions. Furthermore, the increase in tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and S100 calcium-binding protein B (S100B) secretion is considered an essential component of the inflammatory response. We hypothesize that through their action on astrocytes, long-chain saturated fatty acids mediate some of the brain alterations observed in individuals with obesity. Here, we investigate the direct effect of long-chain fatty acids on astrocytes. Primary astrocyte cultures were incubated for 24 hours with myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids (25–100  $\mu$ M). All saturated fatty acids tested led to an increase in TNF- $\alpha$  secretion, but only palmitic acid, one of the most common fatty acids, increased S100B secretion, indicating that S100B secretion is probably not caused in response to TNF- $\alpha$  release. Palmitic acid also caused nuclear migration of nuclear factor kappa B. Long-chain saturated fatty acids did not alter cell viability or redox status. In conclusion, long-chain saturated fatty acids can alter astrocytic homeostasis and may contribute to brain disorders associated with obesity, such as neuroinflammation.

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CNS, central nervous system; COX-2, cyclooxygenase-2; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSH, reduced glutathione; IgG, immunoglobulin G; LPS, lipopolysaccharide; M-TBS, nonfat dried milk powder diluted in Tris buffer saline; MTT, methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; NR, neutral red; PBS, phosphate-buffered saline; RAGE, receptor for advanced glycation end products; S100B, S100 calcium-binding protein B; TBS, Tris buffer saline; TLR4, Toll-like receptor type 4; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

\* Corresponding author at: Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS. Ramiro Barcelos, 2600-anexo. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90035-003.

E-mail address: [marina.leite@ufrgs.br](mailto:marina.leite@ufrgs.br) (M.C. Leite).

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2023.12.007>

0271-5317/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Obesity is a chronic medical condition requiring public health attention because it is related to an increased risk for many diseases, such as cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, and stroke [1], in addition to causing damage to brain physiology and function [2–4]. Long-term intake of high-calorie and high-fat diets is probably one of the leading causes of obesity. In addition to the amount of saturated fat in the diet, it is important to note that the concentrations of fatty acids in human plasma vary significantly because of the influence of several factors, including ethnicity, sex, and individual adiposity [5]. The average plasma concentration of palmitic acid, the major saturated fatty acid in diets, found in some studies vary from 221 [6] to 2667  $\mu\text{M}$  [7,8]; the reference value in the United States for fasting free fatty acids in plasma is 0 to 720  $\mu\text{M}$ .

The brain is very active in lipid synthesis [9] and can also take up lipids from blood, prioritizing uptake of polyunsaturated fatty acids and suppressing entry of cholesterol and saturated and monounsaturated fatty acids. Astrocytes are the primary producers of lipids in the brain; they can take up, oxidize, store, and release fatty acids [10]. The amount of fatty acids in the blood can affect the degree of penetration of fatty acids into the central nervous system (CNS) [11], and these molecules accumulate mainly in astrocytes [12,13]. Toxic effects of long-chain saturated fatty acids have been observed in vivo in pathological conditions that disrupt the brain–blood barrier [14], including diets rich in saturated fatty acids [15]. However, the effect of saturated fatty acids on astrocytes remains poorly explored.

Although the mechanisms by which obesity affects the brain are unclear, there is evidence that inflammation is a critical physiological aspect [2–4]. Some evidence shows that Toll-like receptor type 4 (TLR4) may be activated by long-chain saturated fatty acids [16–18]. In agreement with this, evidence suggests that saturated fatty acids and lipopolysaccharide (LPS) share the same inflammatory signaling pathway as TLR4, promoting expression of proinflammatory transcription factors, such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) [19,20]. Conversely, more recent data indicate that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids, but this remains not fully understood [21]. Of note, palmitic acid is capable of inducing astrocytic activation [22], neuroinflammation [23,24], astrocyte-mediated upregulation of  $\beta$ -secretase 1, and amyloidogenesis in neurons [25,26].

Astrocytes play essential roles in redox status and inflammatory responses since they are able to synthesize and secrete the important brain antioxidant reduced glutathione (GSH) and respond to stimuli by secreting cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) [27]. S100 calcium-binding protein B (S100B) is a calcium-binding protein constitutively expressed by astrocytes in the CNS, and inflammatory agents regulate its secretion [28], for example, LPS [29] and TNF- $\alpha$  [30]. Although no specific receptor has been identified, S100B binds to receptor for advanced end products (RAGE) [31], which is involved in its trophic or toxic effects [32]. In brain disorders, it has been hypothesized that S100B and glial fibrillary acidic protein (GFAP) are involved in astroglial activa-

tion. In fact, changes in the cerebrospinal fluid concentration or serum content of S100B have been linked to several neurological and psychiatric diseases [33,34]. Such disorders involve a significant inflammatory factor, with S100B being repeatedly viewed as a cytokine. Furthermore, S100B modulates and is modulated by proinflammatory cytokines [35–38].

Therefore, we hypothesize that long-chain saturated fatty acids, through their action on astrocytes, influence the CNS damage observed in obesity. Thus, to fill the knowledge gap of the direct effect of these molecules on the functions of astrocytes and the role of astrocytes in CNS damage, we examined how different long-chain saturated fatty acids might affect glial activation parameters and the inflammatory and redox status of primary astrocyte cultures while using polyunsaturated fatty acids as a control.

## 2. Methods and materials

### 2.1. Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 31600-034), Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, 21600-010), fetal bovine serum (12657-029), gentamicin (15710072), and other materials for astrocyte cultures were purchased from GIBCO (Carlsbad, CA, USA). Monoclonal anti-S100B (S2532), anti-goat immunoglobulin G (IgG) peroxidase-linked (A5420), S100B protein (S6677), carbonate–bicarbonate buffer (C3041), albumin from chicken egg white (A5253), Sigma fast O-phenylenediamine dihydrochloride tablets sets (P9187), bisbenzimidazole H 33258 (14530), neutral red (N4638), methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, M5655), glutathione (G4251), o-phtaldehyde (P1378), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, D6883), myristic acid (M3128), palmitic acid (P5585), stearic acid (S4751), linoleic acid (L1012),  $\alpha$ -linolenic acid (L2376), fatty acid-free and low endotoxin bovine serum albumin (A8806), glucose (G5400), HEPES (H7006),  $\text{NaHCO}_3$  (S5761), amphotericin B (A9528), and poly-L-lysine (P1274) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). GFAP (345996) was purchased from Calbiochem and bovine serum albumin Cohn fraction V (1870) from Inlab (São Paulo, Brazil). Polyclonal rabbit anti-S100B (Z0311) and polyclonal rabbit anti-GFAP (Z0334) antibodies were purchased from DAKO (São Paulo, Brazil), and ECL anti-rabbit IgG peroxidase-linked (NA934V) was from Amersham, GE (Amersham, UK). Anti-actin (MAB1501) was purchased from Millipore and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (A11008) from Invitrogen. Anti-NF- $\kappa$ B (SC109), anti-TLR4 (SC16240), anti-RAGE (SC8230), and anti-COX-2 (SC1745) were purchased from Santa Cruz (Dallas, TX, USA). ECL western blotting detection reagents (RPN3004) and other western blot materials were purchased from GE (Little Chalfont, UK). High-binding flat-bottomed plates from Greiner Bio-One were used in enzyme-linked immunosorbent assays (655081). Ethanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Cell culture

Procedures were undertaken in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory

**Table 1 – Structure and nomenclature of fatty acids.**

Common name	IUPAC name	Symbol	Chemical structure
Myristic acid	Tetradecanoic acid	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitic acid	Hexadecanoic acid	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearic acid	Octadecanoic acid	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Linoleic acid	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	18:2n–6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
$\alpha$ -Linolenic acid	(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid	18:3n–3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Animals and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (number 27570). The animals were obtained from the Biochemistry Department of the Federal University of Rio Grande do Sul. Rat primary astrocyte cultures were developed according to the literature [39]. The cerebral cortices of newborn Wistar rats (1–4 days old) were extracted, and the meninges were removed. Then, the cerebral cortices were mechanically dissociated with a Pasteur pipette in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ -free Dulbecco's PBS, pH 7.2, containing (in mM) 137.93 NaCl, 2.66 KCl, 8.09  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 5.55 glucose. After 5 to 10 minutes, the supernatant was centrifuged at 300g for 5 minutes, and the obtained pellet was suspended in DMEM pH 7.6 supplemented with 7.68 mM HEPES, 108.79 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.5 mg/L amphotericin B, 50 mg/L gentamicin, and 10% fetal bovine serum. The cells were counted in a Neubauer chamber and seeded on plates previously coated with poly-L-lysine at a  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> density. Cells were then allowed to grow to confluence for approximately 21 days and maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum in 5%  $\text{CO}_2$ /95% air at 37°C. When the cells were confluent, the culture medium was replaced by fetal bovine serum-free DMEM in the absence or presence of the saturated or unsaturated fatty acids complexed with albumin in concentrations ranging from 25 to 100  $\mu\text{M}$  or vehicle (ethanol plus albumin). Cells were incubated for 24 hours, after which the samples were processed for biochemical and immunological techniques. The dose used was based on previous studies in astrocyte culture [24] and is lower than those found in human plasma [7].

### 2.3. Conjugation of fatty acids with albumin

Fatty acids (Table 1) were conjugated with albumin to make them soluble in the culture medium. Fatty acid stock solutions were prepared in ethanol and stored at  $-20^\circ\text{C}$  (200 mM for all fatty acids, except for stearic acid, whose concentration was 100 mM). A 400- $\mu\text{M}$  fatty acid free and low endotoxin albumin solution was prepared in DMEM on the day of use. Then, each fatty acid solution was conjugated with albumin in a 10:1 ratio (fatty acid:albumin) for 1.5 hours at 37°C, with occasional vortexing. This solution was then added to cells to obtain final fatty acid concentrations ranging from 25 to 100  $\mu\text{M}$ . The final ethanol concentration did not exceed 0.5%.

### 2.4. TNF- $\alpha$ measurement

This assay was carried out in 100  $\mu\text{L}$  of extracellular medium undiluted, using a TNF- $\alpha$  rat enzyme-linked immunosorbent assay kit (88-7340-22) from Invitrogen (MA, USA), following the

manufacturer's instructions. Data were obtained using a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA) and were expressed as pg/mL.

### 2.5. S100B measurement

S100B was measured by enzyme-linked immunosorbent assay [40]. The extracellular medium was collected (for S100B secretion assay) or cells were scraped and mechanically homogenized using a syringe and needle (0.3 mm) in PBS (50 mM NaCl, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , and 80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4), containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (for S100B intracellular content). The extracellular medium was diluted 1:4, and the homogenized cells were diluted 1:200 in PBS with 0.2% albumin from chicken egg. High-binding 96-well plates were incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-S100B diluted 1:1000 in carbonate buffer. The plate was washed with washing buffer (PBS containing 0.1% albumin from chicken egg and 0.05% Tween 20) and blocked with PBS containing 2% albumin from chicken egg for 1 hour at room temperature. The plate was washed, and samples or the standard S100B (range, 0.002–1 ng/mL) were incubated with 50 mM Tris buffer saline (TBS, pH 8.6) containing 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$  for 2 hours at 37°C. The plate was washed, and rabbit anti-S100 polyclonal antibody diluted 1:5000 in PBS containing 0.5% albumin from chicken egg and 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$  was incubated for 30 minutes at 37°C. The plate was washed, and peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibody diluted 1:5000 in PBS containing 0.5% albumin from chicken egg was incubated for 30 minutes at 37°C. The plate was washed, and the o-phenylenediamine dihydrochloride solution was incubated in the dark for 30 minutes at room temperature. The reaction was stopped by adding 3 M HCl. Data were obtained at 492 nm using a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA), normalized by total protein content (for cell lysate) and expressed as percentages of the basal.

### 2.6. GFAP measurement

GFAP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay [41]. The cells were scraped and homogenized in the same way as for the S100B measurement, and the samples were diluted 1:50 in TBS (0.03 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5). High-binding 96-well plates were incubated with samples or standard GFAP (range, 0.1–10 ng) in TBS containing 1 ng/ $\mu\text{L}$  bovine serum albumin overnight at 4°C. The plate was washed with washing buffer (TBS containing 0.1% nonfat dried milk powder and 0.05% Tween 20) and blocked with TBS containing 5% nonfat

dried milk powder (M-TBS) for 2 hours at room temperature. After washing, polyclonal anti-GFAP antibody diluted 1:1000 in 0.5% M-TBS was incubated for 1 hour at room temperature. The plate was washed, and peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibody diluted 1:1000 in 0.5% M-TBS was incubated for 1 hour at room temperature. The plate was washed, and the o-phenylenediamine dihydrochloride solution was incubated in the dark for 30 minutes at room temperature. The reaction was stopped by adding 3M HCl. Data were obtained at 492 nm using a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA), normalized by total protein content and expressed as percentages of the basal.

### 2.7. Immunocytochemistry

The medium was removed, and the cells were fixed for 20 minutes with PBS containing 4% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS and permeabilized with PBS containing 0.2% Triton X-100 for 10 minutes. Then, blocking was performed with PBS containing 5% bovine serum albumin for 1 hour and anti-NF- $\kappa$ B (1:200 in PBS) was incubated overnight at room temperature. Cells were washed with PBS containing 0.2% Triton X-100, and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:200 in PBS) was incubated for 2 hours at room temperature. After washing with PBS containing 0.2% Triton X-100, 100  $\mu$ M bisbenzimidazole was incubated for 10 minutes at room temperature to stain nuclei. Visualization was performed using an Olympus CKX41 Inverted Fluorescence Microscope, and representative images were captured.

### 2.8. Neutral red incorporation assay

Astrocyte cultures were incubated with 50  $\mu$ g/mL of neutral red (NR) in the incubation medium during the last 30 minutes of the fatty acids incubation. Afterward, the cells were rinsed twice with PBS, and NR dye taken up by viable cells was extracted, adding to the cells a solution of acetic acid/ethanol/water (1/50/49) under slow orbital shaking. After the reddish color became homogeneous, the solution was transferred to a microplate and data were obtained at 560 nm in a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA).

### 2.9. MTT reduction assay

Astrocyte cultures were incubated with 50  $\mu$ g/mL of MTT in the incubation medium during the last 30 minutes of the fatty acids incubation. Subsequently, the medium was removed and dimethylsulfoxide (99.9%) was added and left under slow orbital shaking to dissolve the formazan crystals formed by the reduction of MTT. After the purple color became homogeneous, data were obtained at 560 and 650 nm in a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA) and expressed as [(abs 560 nm – abs 650 nm)].

### 2.10. GSH content assay

The medium was removed and astrocyte cultures were mechanically homogenized in KCl phosphate buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 140 mM KCl, pH 7.4) using a syringe and needle

(0.3 mm). GSH content was measured as previously described [42]. Samples plus 1.7% meta-phosphoric acid were centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was incubated in a sodium phosphate buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.0) with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL in methanol) in 96-well black microplates in the dark for 15 minutes at room temperature. The fluorescence was measured using 350 nm (excitation) and 420 nm (emission) using a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA). A standard curve was performed with glutathione (0.977–500  $\mu$ M). Data were expressed as nmol/mg protein.

### 2.11. DCFH oxidation

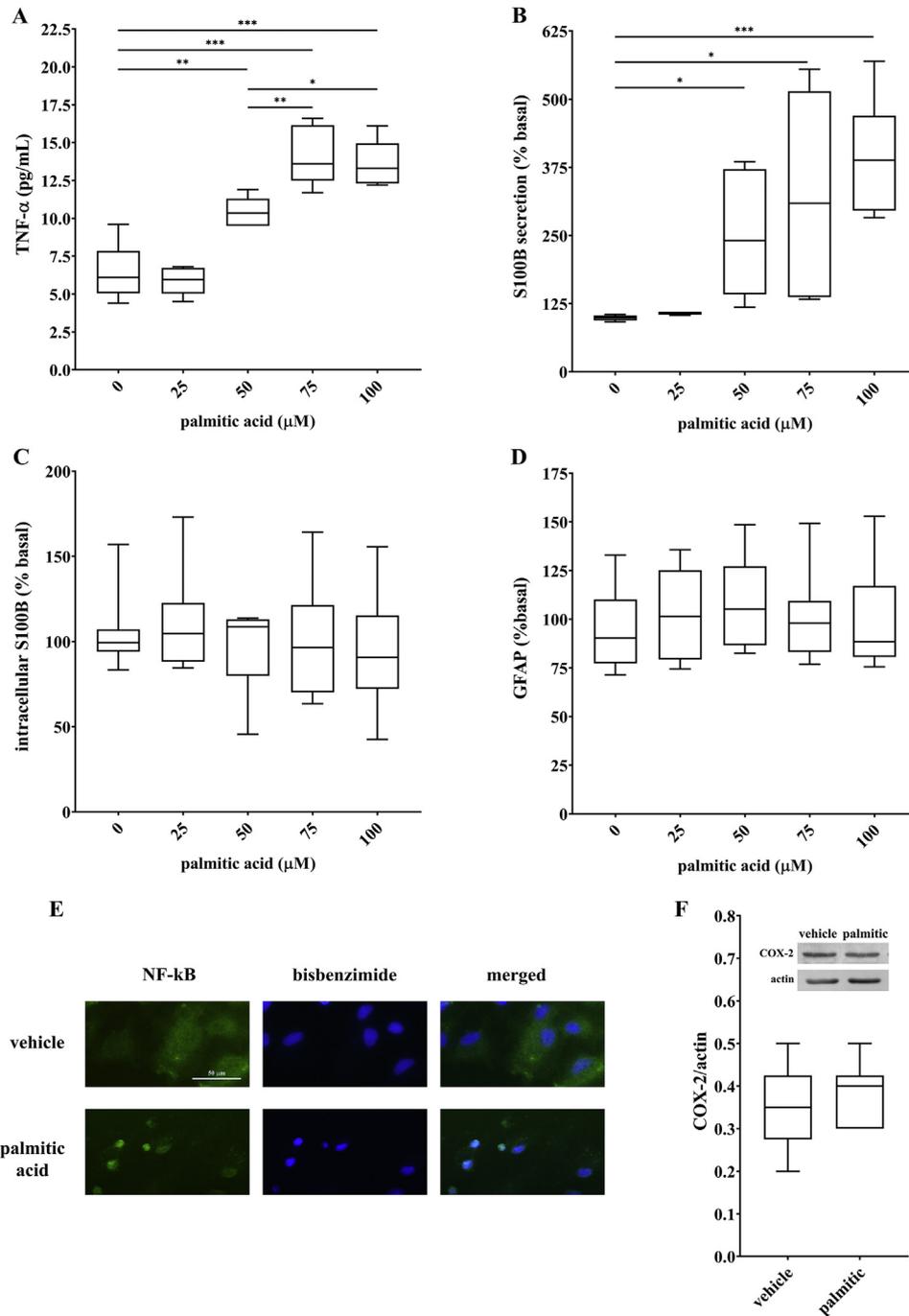
Intracellular reactive oxygen species production was measured using the cell-permeating compound DCFH-DA [43]. Astrocyte cultures were incubated with 10  $\mu$ M of DCFH-DA in the incubation medium in the dark during the last 30 minutes of the fatty acids incubation. Cells were rinsed with PBS, scraped, and mechanically homogenized with a syringe and needle (0.3 mm) in PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured using 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) on a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA). The data obtained were normalized by the total protein content and were expressed as percentages of the basal.

### 2.12. Western blot analysis for COX-2, RAGE, and TLR4

The medium was removed, and astrocyte cultures were scraped and homogenized in electrophoresis sample buffer (4% SDS, 2 mM EDTA, and 50 mM Tris) and boiled for 5 minutes. The samples were centrifuged (10,000g for 5 minutes at 4°C), and the supernatant was used to measure the amount of protein. Subsequently, a solution with 40% glycerol, 50 mM Tris, and bromophenol blue containing 5% mercaptoethanol was added. Equal amounts (10  $\mu$ g) of total protein were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked overnight with 2% bovine serum albumin in TBS at 4 °C and then incubated for 1 hour with anti-COX-2, anti-RAGE, or anti-TLR4 antibodies (1:10,000 in TBS containing 0.005% Tween 20 and 1% bovine serum albumin) at 4°C. After that, membranes were incubated for 1 hour at 4 °C with peroxidase-conjugated anti-goat antibody (1:10,000). Equivalent loading for each sample was confirmed with anti-actin (1:10,000 in TBS containing 0.005% Tween 20 and 1% bovine serum albumin). Luminol was the substrate for the chemiluminescent reactions, measured in the luminescence image analyzer (Image Quant LAS4000, GE). The protein content of COX-2, RAGE, TLR4, and actin was determined by optical density of the respective bands (ImageJ software), and data were expressed as protein/actin ratio.

### 2.13. Protein determination

Protein content was evaluated by the Lowry method, modified by Peterson. Data were obtained at 750 nm using a microplate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, USA) and compared with a bovine albumin standard curve, ranging from 2 to 40  $\mu$ g/well [44].



**Fig. 1 – Palmitic acid increases TNF- $\alpha$  and S100B secretions and NF- $\kappa$ B translocation without altering the intracellular contents of S100B, GFAP, or COX-2 in primary astrocyte cells.** Astrocytes were incubated with 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, or 100  $\mu$ M of palmitic acid for 24 hours, and the extracellular medium was collected to evaluate (A) the TNF- $\alpha$  and (B) S100B secretions, or the intracellular content was used to measure the contents of (C) S100B or (D) GFAP. Astrocytes were incubated with 75  $\mu$ M palmitic acid for 24 hours, in (E) representative images of immunofluorescence analysis of NF- $\kappa$ B (left) in green, bisbenzimidazole staining in blue (central) stains the nuclei and the merged image (right). Scale bar = 50  $\mu$ m. Astrocytes were incubated with 75  $\mu$ M palmitic acid for 24 hours, and the (F) COX-2 content was quantified. One-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest in (A), Kruskal-Wallis method followed by pairwise comparison (Dunn-Bonferroni) in (B), (C), and (D), or Student t-test in (F) were performed. Data are presented as box-and-whiskers plots from at least 5 independent experiments performed in triplicate, where the bottom and the top of the box represent the 25th and 75th quartiles, respectively, the horizontal line is the median, and the whiskers show the 5th and 95th percentile. \* $P$   $\leq$  .05, \*\*\* $P$   $\leq$  .01, \*\*\*\* $P$   $\leq$  .001. ANOVA, analysis of variance; COX-2, cyclooxygenase-2; GFAP, glial fibrillary acidic protein; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; S100B, S100 calcium-binding protein B; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.

## 2.14. Statistical analyses

SPSS software version 20.0 was used to perform the statistical analysis. When there were 2 experimental groups, a Student t-test was performed. For 3 or more experimental groups, the Shapiro-Wilk procedure and Levene test were performed to test the normality and homogeneity of variances, respectively. If homogeneity and normal distribution were assumed, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Bonferroni post hoc for multiple comparisons when applied. When homogeneity or normality were not assumed, the non-parametric Kruskal-Wallis method was used, followed by pairwise comparison (Dunn-Bonferroni) when applied. The statistical analyses used in each graph are indicated in the legends. Data were considered statistically significant when  $P < .05$  and are indicated with asterisks in the figure graphs. Data are presented as box-and-whiskers plots, in which the bottom and the top of the box represent the 25th and 75th quartiles, respectively, the horizontal line is the median, and the whiskers show the 5th and 95th percentile. GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to draw figures.

## 3. Results

### 3.1. Palmitic acid increases TNF- $\alpha$ and S100B secretion, activating nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, in astrocytes

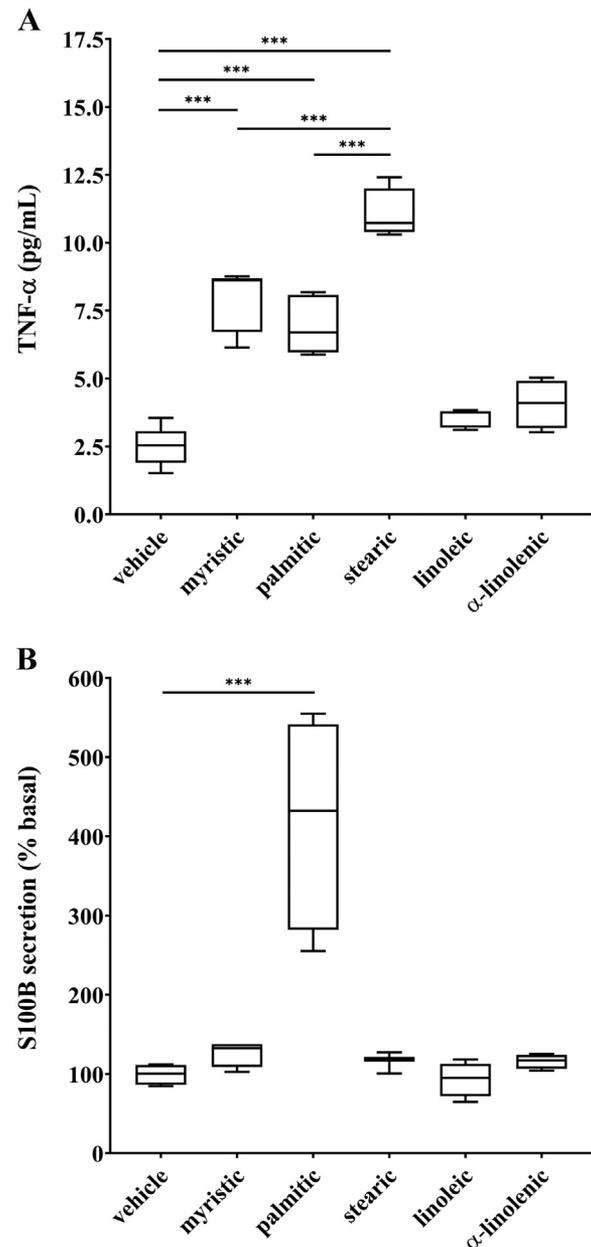
First, the effect of different doses of palmitic acid was analyzed on astrocyte cultures. Primary astrocytes were incubated with 25, 50, 75, or 100  $\mu$ M palmitic acid for 24 hours, and assays were performed to determine TNF- $\alpha$  secretion, S100B secretion and content, and GFAP content (Fig. 1A-D). We observed that 50  $\mu$ M ( $P = .002$ ), 75  $\mu$ M ( $P \leq .001$ ), or 100  $\mu$ M ( $P \leq .001$ ) palmitic acid caused an increase in secretion of TNF- $\alpha$  in relation to vehicle. Furthermore, we found that 75  $\mu$ M and 100  $\mu$ M palmitic acid caused a greater increase in the secretion of this cytokine than 50  $\mu$ M palmitic acid ( $P = .004$  and  $P = .024$ , respectively) (Fig. 1A).

After that, the astrocytic characteristic proteins S100B and GFAP were investigated. Secretion of the S100B protein was increased in relation to vehicle in cells exposed to 50  $\mu$ M ( $H[4] = 20.346$ ,  $P = .040$ ), 75  $\mu$ M ( $H[4] = 20.346$ ,  $P = .011$ ), or 100  $\mu$ M ( $H[4] = 20.346$ ,  $P \leq .001$ ) palmitic acid (Fig. 1B), without changes in S100B (Fig. 1C) or GFAP intracellular contents (Fig. 1D) ( $P > .05$  for all).

Considering that 75  $\mu$ M of palmitic acid caused an increase in TNF- $\alpha$  secretion greater than that of 50  $\mu$ M and to the same extent as 100  $\mu$ M, we selected the concentration of 75  $\mu$ M for further experiments. Costaining of NF- $\kappa$ B and bisbenzimidazole showed nuclear migration of NF- $\kappa$ B in astrocytes stimulated by palmitic acid (Fig. 1E), without differences in COX-2 protein content (Fig. 1F,  $P > .05$ ).

### 3.2. Saturated fatty acids increase TNF- $\alpha$ secretion, but only palmitic acid alters S100B secretion, in astrocytes

The next step was to evaluate the effect of 75  $\mu$ M of other saturated or unsaturated fatty acids incubated for 24 hours in primary astrocyte cultures on TNF- $\alpha$  and S100B secretion (Fig. 2).



**Fig. 2 – Saturated fatty acids increase TNF- $\alpha$  secretion, but only palmitic acid increases S100B secretion in primary astrocyte cells. Astrocytes were incubated with 75  $\mu$ M myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids for 24 hours, and the extracellular medium was collected to evaluate the secretion of (A) TNF- $\alpha$  and (B) S100B. One-way ANOVA followed by Bonferroni posttest was performed. Data are presented as box-and-whiskers plots from at least 4 independent experiments performed in triplicate, where the bottom and the top of the box represent the 25th and 75th quartiles, respectively, the horizontal line is the median, and the whiskers show the 5th and 95th percentile. \*\*\* $P \leq .001$ . ANOVA, analysis of variance; S100B, S100 calcium-binding protein B; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.**

Saturated fatty acids, myristic ( $P \leq .001$ ), palmitic ( $P \leq .001$ ), or stearic ( $P \leq .001$ ), increased TNF- $\alpha$  secretion compared with vehicle. Stearic acid induced a greater increase in TNF- $\alpha$  secretion than myristic ( $P \leq 0.001$ ) or palmitic ( $P \leq 0.001$ ) acids. Furthermore, unsaturated fatty acids did not change secretion of this cytokine (Fig. 2A,  $P > .05$ ). Interestingly, only palmitic acid was able to increase S100B secretion ( $P \leq .001$ ) (Fig. 2B). We also evaluated S100B secretion and S100B and GFAP contents at 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$  for myristic, stearic, linoleic, and  $\alpha$ -linolenic acids, but no changes were observed (data not shown).

### 3.3. Saturated or unsaturated fatty acids do not alter cell viability or redox status in cultured astrocytes

The effect of 100  $\mu\text{M}$  myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids for 24 h on cell viability was analyzed by NR incorporation and MTT assays. The NR incorporation assay evaluates cellular endocytic capacity through endocytosis of the dye that accumulates in lysosomes [45]; the MTT reduction assay is a method that assesses the redox capacity of cells through cellular ability to reduce MTT [46]. We found no significant differences in either NR incorporation (Fig. 3A) or MTT reduction (Fig. 3B) ( $P > .05$  for all), suggesting no decrease in the viability of cells incubated with the saturated or unsaturated fatty acids tested.

Cell redox capacity was evaluated in primary astrocytes after incubation with 75  $\mu\text{M}$  fatty acids for 24 hours. Saturated or unsaturated fatty acids did not alter the GSH content of the cells (Fig. 3C,  $P > .05$ ). Therefore, to confirm the redox conditions of cells incubated with saturated fatty acids, DCFH oxidation was measured; this is an assay widely used as a fluorescent probe to detect intracellular reactive oxygen species. According to the results of GSH contents, DCFH oxidation was not altered by addition of saturated fatty acids (Fig. 3D,  $P > .05$ ).

### 3.4. Saturated or unsaturated fatty acids do not change RAGE and TLR4 contents in astrocytes

Finally, we evaluated expression of RAGE, a receptor for S100B, and TLR4, which is proposed as a cellular receptor for saturated fatty acids. RAGE and TLR4 protein contents were measured in astrocytes after incubation with myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids; however, no significant alterations were observed (Fig. 4) ( $P > .05$  for all).

## 4. Discussion

The present study showed that long-chain saturated fatty acids induce astrocytes to release cytokines and that palmitic acid increases S100B secretion, supporting the hypothesis that they affect astrocyte homeostasis and act as mediators of the effects of obesity in the brain. Our results contribute to the search for mechanisms involved in the relationship between obesity and its associated brain disorders.

Saturated fatty acids from a high-fat diet or dysregulated lipolysis can induce and propagate the low-grade inflammation seen in individuals with obesity [47]. In vitro studies show that saturated, but not unsaturated, medium or,

mainly, long-chain fatty acids also have an inflammatory effect on macrophages, monocytes, astrocytes, and dendritic cells [16,18,24,48–50]. The toxicity of free fatty acids in different brain cell types is related to the development of dementia [51], and increased concentrations of palmitic acid have been identified in the parietal cortex of Alzheimer patients [52]. On the other hand, polyunsaturated fatty acids have been described as neuroprotective because of their anti-inflammatory and anti-apoptotic properties [53,54]; therefore, they were used as controls for addition of fatty acids in this study.

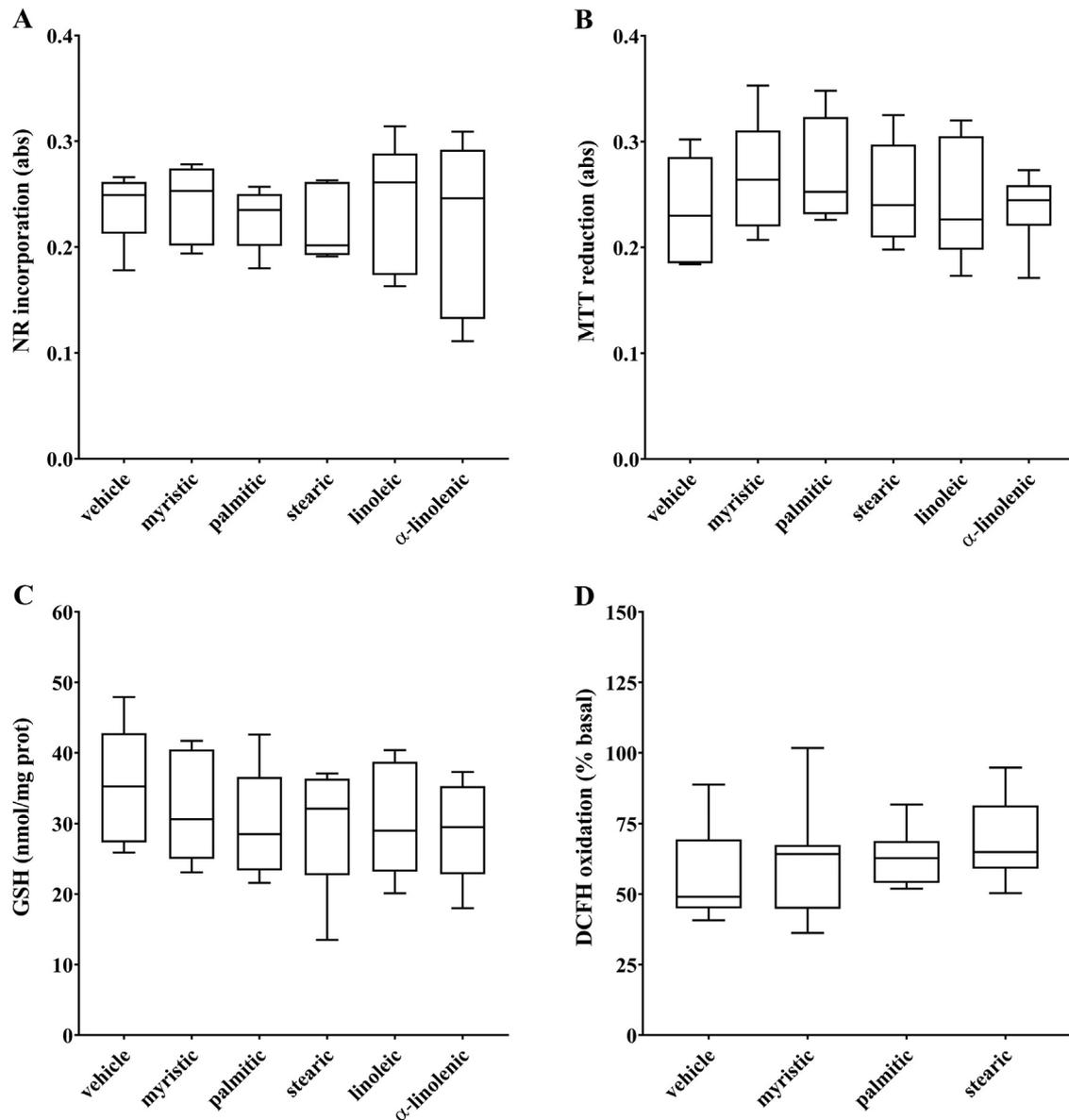
This study was designed with a focus on physiological relevance, considering a brain–blood barrier disruption condition. Astrocytes are the main brain cells that take up and metabolize fatty acids [10], and the concentration of free fatty acids used was similar to the plasma concentration [11]. We showed for the first time that palmitic acid increases S100B secretion, in addition to increasing TNF- $\alpha$  secretion starting at 50  $\mu\text{M}$ . Considering that 75  $\mu\text{M}$  palmitic acid led to greater secretion of TNF- $\alpha$  than 50  $\mu\text{M}$  palmitic acid, this concentration was chosen for ensuing assays and for the other fatty acids used in the study.

To confirm the inflammatory status induced by palmitic acid in astrocyte culture, we assessed nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, a critical transcription factor in regulating production of proinflammatory cytokines [55]. We observed that palmitic acid increased nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, corroborating previous research in other cell types [56–58]. However, no changes in protein expression of COX-2, an inducible enzyme expressed in response to inflammation and physiological stimuli [59], were observed.

Despite altering S100B secretion, palmitic acid did not alter its intracellular content. Less than 1% of total S100B is secreted [60]. Although increases in its secretion may be associated with a decrease in its intracellular content [30], there is much evidence showing that variations in intra- and extracellular S100B are not always directly associated [29,35,61]. Inflammation can lead to astrogliosis, which is often accompanied by an increase in GFAP; however, we did not observe any change in the content of this protein.

As a result, we focused on investigating the effect of other saturated and unsaturated fatty acids on S100B and TNF- $\alpha$  secretion. We observed an increase in TNF- $\alpha$  secretion in astrocytes exposed to myristic, palmitic, or stearic fatty acids, but not to linoleic and  $\alpha$ -linolenic fatty acids, indicating that this effect is specific for saturated fatty acids, as previously observed [24]. Interestingly, stearic acid induced a greater increase in TNF- $\alpha$  secretion than myristic or palmitic acids, and S100B secretion was increased only by palmitic acid. This is an important finding because, at least in this condition, S100B is not released in response to TNF- $\alpha$ , as suggested by some previous observations [28,30,38,62–65]. In fact, stearic acid, which caused a greater increase in TNF- $\alpha$ , did not alter S100B secretion, showing that astrocytes may demonstrate an inflammatory response, secreting TNF- $\alpha$  without necessarily increasing S100B secretion.

At high extracellular concentrations, the S100B protein can act as a cytokine, exhibiting dose-dependent effects on nervous tissue and stimulating expression of proinflammatory cytokines. This proinflammatory effect of S100B has been at-

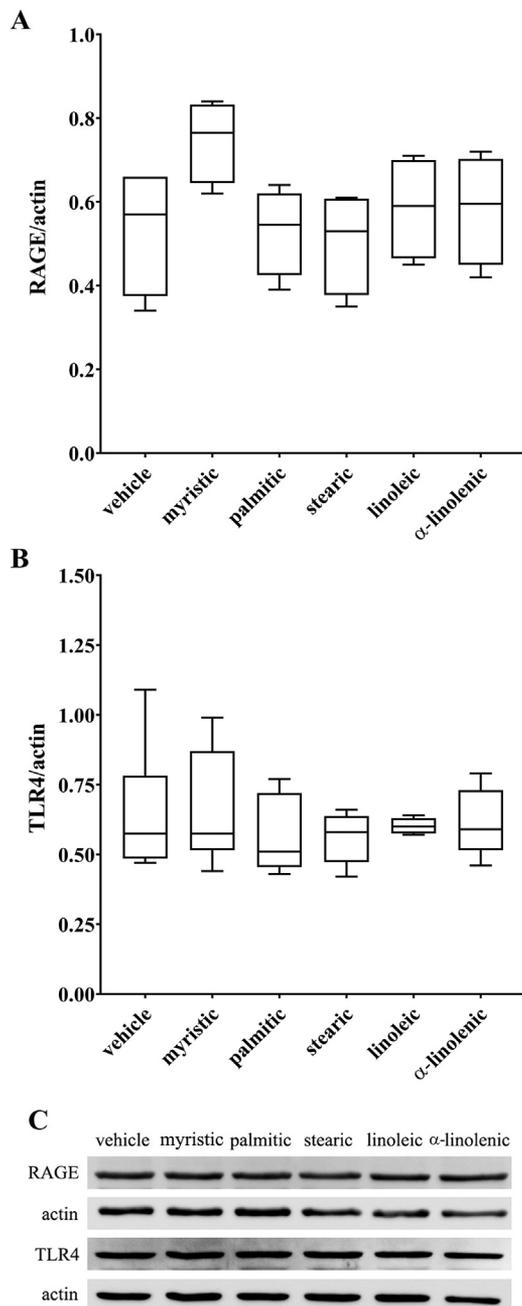


**Fig. 3** – Saturated or unsaturated fatty acids do not alter cell viability, GSH content, or DCFH oxidation in primary astrocyte cells. Astrocytes were incubated with 100  $\mu\text{M}$  myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids for 24 hours, and the cell viability was evaluated by (A) NR incorporation and (B) MTT reduction. Astrocytes were incubated with 75  $\mu\text{M}$  myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids for 24 hours, and (C) GSH content or (D) DCFH oxidation was measured. Kruskal-Wallis method followed by pairwise comparison (Dunn-Bonferroni) in (A) or one-way ANOVA followed by Bonferroni posttest in (B), (C), and (D). Data are presented as box-and-whiskers plots from at least 4 independent experiments performed in triplicate, where the bottom and the top of the box represent the 25th and 75th quartiles, respectively, the horizontal line is the median, and the whiskers show the 5th and 95th percentile. ANOVA, analysis of variance; DCFH, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; GSH, reduced glutathione; MTT, methyl thiazolyl diphenyl-tetrazolium bromide; NR, neutral red.

tributed to its affinity for the receptor RAGE [37,38,66,67]. However, in our study, we did not observe changes in RAGE protein expression, even with palmitic acid, which caused an increase in S100B and TNF- $\alpha$ . Nevertheless, we cannot rule out involvement of RAGE based only on its protein expression; more studies should be conducted to address this issue.

It is interesting to note that the saturated fatty acids used in this work are very similar in structure (Table 1) but quite

different in their metabolism and physical properties, which may be the reason for the particular astrocytic response observed, as previously found for other cell types [68–71]. All the saturated fatty acids tested in this study increased inflammation, as assessed by TNF- $\alpha$  release, but only palmitic acid modulated S100B. A previous study by our group showed that astrocytes exposed for 24 hours to LPS showed increased TNF- $\alpha$  secretion by the same magnitude as that from palmitic acid.



**Fig. 4 – Saturated or unsaturated fatty acids do not change the immunocent content of RAGE and TLR4 in primary astrocyte cells. Astrocytes were incubated with 75  $\mu$ M myristic, palmitic, stearic, linoleic, or  $\alpha$ -linolenic acids for 24 hours. (A) RAGE. (B) TLR4. (C) Western blot representative images of RAGE, TLR4, and  $\beta$ -actin. One-way ANOVA followed by Bonferroni posttest in (A) or Kruskal-Wallis followed by pairwise comparison (Dunn-Bonferroni) in (B). Data are presented as box-and-whiskers plots from at least 4 independent experiments performed in triplicate, where the bottom and the top of the box represent the 25th and 75th quartiles, respectively, the horizontal line is the median, and the whiskers show the 5th and 95th percentile. ANOVA, analysis of variance; RAGE, receptor for advanced glycation end products; TLR4, Toll-like receptor type 4.**

However, it was associated with a reduction in S100B secretion [29].

Oxidative stress has been associated with development of pathological conditions such as neuroinflammatory diseases. In this study, we did not observe any changes in GSH content or reactive oxygen species (measured by DCFH) in astrocytes exposed to saturated fatty acids. There was also no change in cell viability, even at the highest fatty acid concentration tested. These observations indicate that saturated fatty acids can alter astrocyte inflammatory signaling pathways, as measured by TNF- $\alpha$  secretion and NF- $\kappa$ B nuclear translocation, even without evident changes in oxidative parameters or cell damage. However, a more detailed redox status investigation is still needed.

TLR4 activation by its ligands, such as LPS, triggers inflammation and might be an important molecular mechanism of fatty acid neurotoxicity. However, under our experimental conditions, none of the fatty acids caused changes in TLR4 protein expression, indicating that long-chain saturated fatty acids may not be agonists, as previously suggested [21]. However, more specific studies are needed to clarify that.

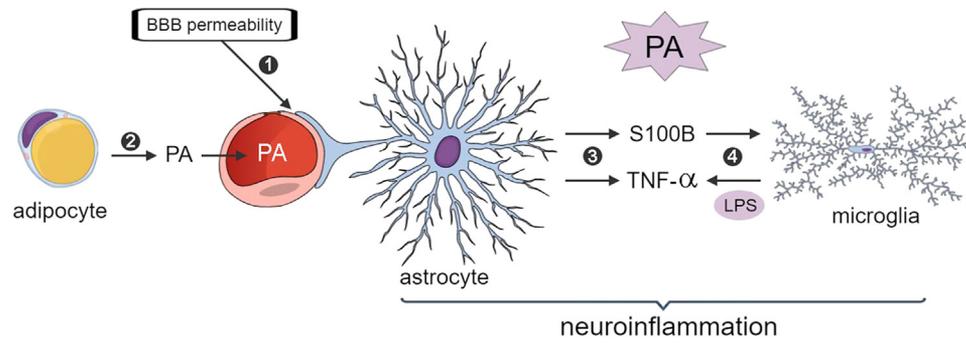
The correlation between elevated peripheral inflammatory markers and psychiatric disorders has been previously demonstrated; however, the molecular mechanisms have not yet been elucidated. Medical conditions such as depression, posttraumatic stress disorder, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus are associated with increased concentration of saturated fatty acids and LPS in the circulation [72]. A recent study showed that low doses of LPS and palmitic acid stimulate robust expression of proinflammatory cytokines, and that the combination of these molecules further increases proinflammatory cytokine expression in the HMC3-human microglial cell line [72]. Thus, we hypothesize that in situations with increased circulating palmitic acid and greater blood-brain barrier permeability, the communication between peripheral tissues and the brain is mediated by palmitic acid, along with other molecules (Fig. 5).

It is essential to point out that the present research was carried out in isolated astrocytes, allowing us to analyze the direct effect of long-chain saturated fatty acids on these cells but in a model that lacks communication with other cell types. In addition, the doses used were relatively low, which is vital to demonstrate how long-chain saturated fatty acids can have harmful effects on astrocytes, even at low concentrations.

Our data reinforce that astrocytes are sensitive to free fatty acids, which may play an important role in the pathogenesis of the CNS complications occurring in obesity and dementia. In addition, we emphasize that saturated fatty acids from the diet or from metabolism itself may be one of the causes of the low-grade chronic inflammation found in obesity because they are capable of triggering release of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , in the brain, which can activate inflammatory responses and the innate immune system in the body.

## Sources of Support

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fun-



**Fig. 5 – An integrative view of the effect of palmitic acid on astrocytes and microglia. In situations of BBB dysfunction (1), PA released by adipocytes during lipolysis (2) can reach the CNS, connecting the toxic effects of long-chain saturated fatty acids and neuroinflammation. We show that PA stimulates astrocytic TNF- $\alpha$  and S100B secretion (3), and it is known that S100B can stimulate microglial TNF- $\alpha$  secretion (4), which is potentiated by LPS. This process may contribute to the neuroinflammation observed in the pathogenesis of the CNS complications of obesity and dementia. BBB, blood-brain barrier; CNS, central nervous system; LPS, lipopolysaccharide; PA, palmitic acid; S100B, S100 calcium-binding protein B; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha.**

dação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN). The funding sources were not involved in the study design, in the collection, analysis, or interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

### Data availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author on request.

### Author Declarations

The authors have no relevant financial or nonfinancial interests to disclose.

### CRedit authorship contribution statement

**Fernanda Telles Fróes:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration. **Carollina Da Ré:** Methodology, Validation, Investigation. **Jéssica Taday:** Methodology, Validation, Investigation. **Fabiana Galland:** Methodology, Validation, Investigation. **Carlos Alberto Gonçalves:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Marina Concli Leite:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition.

### Acknowledgment

The authors thank AJE for the editing assistance.

### REFERENCES

- [1] Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet*. 2005;366:1197–209. doi:10.1016/S0140-6736(05)67483-1.
- [2] Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. *Trends Neurosci*. 2017;40:237–53. doi:10.1016/j.tins.2017.02.005.
- [3] Tanaka H, Gourley DD, Dekhtyar M, Haley AP. Cognition, brain structure, and brain function in individuals with obesity and related disorders. *Curr Obes Rep*. 2020;9:544–9. doi:10.1007/s13679-020-00412-y.
- [4] Han YP, Tang X, Han M, Yang J, Cardoso MA, Zhou J, et al. Relationship between obesity and structural brain abnormality: accumulated evidence from observational studies. *Ageing Res Rev*. 2021;71:e101445. doi:10.1016/j.arr.2021.101445.
- [5] Henderson GC. Plasma free fatty acid concentration as a modifiable risk factor for metabolic disease. *Nutrients*. 2021;13:2590–604. doi:10.3390/nu13082590.
- [6] Ney JG, Torres AG, Trugo NMF. Análise de ácidos graxos não-esterificados de plasma humano por cromatografia gasosa capilar com injeção sem divisão de fluxo. *Quím Nova*. 2004;27:561–6 Portuguese.
- [7] Abdelmagid SA, Clarke SE, Nielsen DE, Badawi A, El-Sohehy A, Mutch DM, et al. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS One*. 2015;10:e0116195. doi:10.1371/journal.pone.0116195.
- [8] Lust CAC, Bi X, Henry CJ, Ma DWL. Development of fatty acid reference ranges and relationship with lipid biomarkers in middle-aged healthy Singaporean men and women. *Nutrients*. 2021;13:435–49. doi:10.3390/nu13020435.
- [9] Edmond J. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci*. 2001;16:181–93. doi:10.1385/JMN:16:2-3:181.
- [10] Rebelos E, Hirvonen J, Buccini M, Pekkarinen L, Nyman M, Hannukainen JC, et al. Brain free fatty acid uptake is elevated in morbid obesity, and is irreversible 6 months after bariatric surgery: a positron emission tomography study. *Diabetes Obes Metab*. 2020;22:1074–82. doi:10.1111/dom.13996.
- [11] Curi R, Pompeia C, Myasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos, São Paulo: Manole; 2002. Portuguese.

- [12] Morand O, Baumann N, Bourre JM. In vivo incorporation of exogenous [1-14C]stearic acid into neurons and astrocytes. *Neurosci Lett.* 1979;13:177–81. doi:10.1016/0304-3940(79)90038-7.
- [13] Bernoud N, Fenart L, Bénistant C, Pageaux JF, Dehouck MP, Molière P, et al. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res.* 1998;39:1816–24. doi:10.1016/S0022-2275(20)32169-6.
- [14] de Boer AG, Gaillard PJ. Blood–brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm.* 2006;113:455–62. doi:10.1007/s00702-005-0375-4.
- [15] Takechi R, Pallebage-Gamarallage MM, Lam V, Giles C, Mamo JC. Aging-related changes in blood-brain barrier integrity and the effect of dietary fat. *Neurodegener Dis.* 2013;12:125–35. doi:10.1159/000343211.
- [16] Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276:16683–9. doi:10.1074/jbc.M011695200.
- [17] Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:84–91. doi:10.1161/01.ATV.0000251608.09329.9a.
- [18] Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012;53:2002–13. doi:10.1194/jlr.D029546.
- [19] Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2003;278:37041–51. doi:10.1074/jbc.M305213200.
- [20] Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis.* 2016;244:211–15. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.
- [21] Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, Kammoun HL, Reibe S, Estevez E, et al. Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism. *Cell Metab.* 2018;27:1096–110. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.014.
- [22] Liu L, Martin R, Chan C. Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol Aging.* 2013;34:540–50. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.017.
- [23] Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology.* 2010;151:576–85. doi:10.1210/en.2009-1122.
- [24] Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes: fatty acids and glial inflammation. *J Neurochem.* 2012;120:1060–71. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x.
- [25] Patil S, Sheng L, Masserang A, Chan C. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2006;406:55–9. doi:10.1016/j.neulet.2006.07.015.
- [26] Flores-León M, Pérez-Domínguez M, González-Barrios R, Arias C. Palmitic acid-induced NAD<sup>+</sup> depletion is associated with the reduced function of SIRT1 and increased expression of BACE1 in hippocampal neurons. *Neurochem Res.* 2019;44:1745–54. doi:10.1007/s11064-019-02810-8.
- [27] Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev.* 2018;98:239–389. doi:10.1152/physrev.00042.2016.
- [28] de Souza DF, Wartchow K, Hansen F, Lunardi P, Guerra MC, Nardin P, et al. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;43:14–22. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.12.001.
- [29] Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Ré C, Negri E, Engelke DS, et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation.* 2011;8:128–39. doi:10.1186/1742-2094-8-128.
- [30] Edwards MM, Robinson SR. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006;113:1709–15. doi:10.1007/s00702-006-0479-5.
- [31] Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13:24–57. doi:10.2174/1566524011307010024.
- [32] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–68. doi:10.1016/S1357-2725(01)00046-2.
- [33] Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60:614–32. doi:10.1002/jemt.10303.
- [34] Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* 2007;85:1373–80. doi:10.1002/jnr.21211.
- [35] de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, et al. S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$  in glial cultures and hippocampal slices of rats: likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 2009;206:52–7. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.10.012.
- [36] Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol Aging.* 2004;25:431–9. doi:10.1016/S0197-4580(03)00126-X.
- [37] Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol.* 2007;184:214–22. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.12.011.
- [38] Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 2010;31:665–77. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.017.
- [39] Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res.* 1999;833:142–9. doi:10.1016/S0006-8993(99)01503-6.
- [40] Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 2008;169:93–9. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.021.
- [41] Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods.* 2007;162:282–6. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.001.
- [42] Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 1998;108:347–52. doi:10.1385/0-89603-472-0-347.

- [43] Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Kleinkauf-Rocha J, Souza DO, Riesgo R, Gonçalves CA, et al. Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:11–15. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.08.023.
- [44] Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977;83:346–56. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4.
- [45] Borenfreund E, Borrero O. In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biol Toxicol*. 1984;1:55–65. doi:10.1007/BF00125565.
- [46] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [47] Curley S, Gall J, Byrne R, Yvan-Charvet L, McGillicuddy FC. Metabolic inflammation in obesity-at the crossroads between fatty acid and cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65:e1900482. doi:10.1002/mnfr.201900482.
- [48] Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem*. 2004;279:16971–9. doi:10.1074/jbc.M312990200.
- [49] Laine PS, Schwartz EA, Wang Y, Zhang W-Y, Karnik SK, Musi N, et al. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- $\kappa$ B activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358:150–5. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.092.
- [50] Calder PC. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16:425–33. doi:10.1097/MCO.0b013e3283620616.
- [51] Mukamal KJ. Nonesterified fatty acids, cognitive decline, and dementia. *Curr Opin Lipidol*. 2020;31:1–7. doi:10.1097/MOL.0000000000000656.
- [52] Fraser T, Tayler H, Love S. Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2010;35:503–13. doi:10.1007/s11064-009-0087-5.
- [53] Zendedel A, Habib P, Dang J, Lammerding L, Hoffmann S, Beyer C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol*. 2015;278:200–11. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.11.007.
- [54] Desai A, Park T, Barnes J, Kevala K, Chen H, Kim H-Y. Reduced acute neuroinflammation and improved functional recovery after traumatic brain injury by  $\alpha$ -linolenic acid supplementation in mice. *J Neuroinflammation*. 2016;13:253–63. doi:10.1186/s12974-016-0714-4.
- [55] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:49–62. doi:10.1038/nrm2083.
- [56] Yuan S, Liu H, Yuan D, Xu J, Chen Y, Xu X, et al. PNPLA3 I148M mediates the regulatory effect of NF- $\kappa$ B on inflammation in PA-treated HepG2 cells. *J Cell Mol Med*. 2020;24:1541–52. doi:10.1111/jcmm.14839.
- [57] Alnahdi A, John A, Raza H. Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells by palmitic acid. *Nutrients*. 2019;11:1979–2000. doi:10.3390/nu11091979.
- [58] Hwangbo H, SY Ji, Kim MY, Kim SY, Lee H, Kim G-Y, et al. Anti-inflammatory effect of auranofin on palmitic acid and LPS-induced inflammatory response by modulating TLR4 and NOX4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW264.7 macrophages. *Int J Mol Sci*. 2021;22:5920–37. doi:10.3390/ijms22115920.
- [59] Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*. 1999;106(suppl 5):S37–42. doi:10.1016/s0002-9343(99)00115-1.
- [60] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2009;1793:1008–22. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009.
- [61] Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA, et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*. 2000;486:203–7. doi:10.1016/S0014-5793(00)02301-2.
- [62] Vizuete AFK, de Lima Cordeiro J, Neves JD, Seady M, Grun LK, Barbé-Tuana FM, et al. Arundic acid (ONO-2526) inhibits stimulated-S100B secretion in inflammatory conditions. *Neurosci Lett*. 2021;751:e135776. doi:10.1016/j.neulet.2021.135776.
- [63] Chen L, Chen L, Lv Y, Cui Z, Bei G, Qin G, et al. Tetrandrine ameliorates cognitive impairment via inhibiting astrocyte-derived S100B activation in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol Res*. 2013;35:614–21. doi:10.1179/1743132813Y.0000000175.
- [64] Zhu L, Weng Z, Shen P, Zhou J, Zeng J, Weng F, et al. S100B regulates inflammatory response during osteoarthritis via fibroblast growth factor receptor 1 signaling. *Mol Med Report*. 2018;48:55–64. doi:10.3892/mmr.2018.9523.
- [65] Lasek-Bal A, Jedrzejowska-Szypulka H, Student S, Warsz-Wianecka A, Zareba K, Puz P, et al. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70:209–17. doi:10.26402/jpp.2019.2.04.
- [66] Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21:97–108.
- [67] Fujiya A, Nagasaki H, Seino Y, Okawa T, Kato J, Fukami A, et al. The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22:371–9. doi:10.1002/oby.20532.
- [68] Bruce JS, Salter AM. Metabolic fate of oleic acid, palmitic acid and stearic acid in cultured hamster hepatocytes. *Biochem J*. 1996;316:847–52. doi:10.1042/bj3160847.
- [69] Moers A, Schrezenmeier J. Palmitic acid but not stearic acid inhibits NO-production in endothelial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997;105(suppl 2):S78–80. doi:10.1055/s-0029-1211804.
- [70] Rioux V, Lemarchal P, Legrand P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. *J Nutr Biochem*. 2000;11:198–207. doi:10.1016/s0955-2863(00)00065-6.
- [71] Sakai H, Matsumoto KI, Urano T, Sakane F. Myristic acid selectively augments  $\beta$ -tubulin levels in C2C12 myotubes via diacylglycerol kinase  $\delta$ . *FEBS Open Biol*. 2022;12:1788–96. doi:10.1002/2211-5463.13466.
- [72] Lu Z, Liu S, Lopes-Virella MF, Wang Z. LPS and palmitic acid co-upregulate microglia activation and neuroinflammatory response. *Compr Psychoneuroendocrinol*. 2021;6:e100048. doi:10.1016/j.cpnec.2021.100048.

### **CAPÍTULO III**

Efeitos de cinamaldeído e de seu metabólito benzoato de sódio em condições normais e em diferentes modelos de toxicidade induzida em cultura primária de astrócitos

Artigo em fase de coleta de dados

### **PARTE III**

## 7. DISCUSSÃO

A expectativa de vida da população tem aumentado ao redor do mundo (UNITED NATIONS DEPARTMENT FOR ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, 2023), porém com o envelhecimento da população, as doenças neurodegenerativas se tornaram uma questão relevante de saúde pública. Muitas dessas doenças, assim como algumas desordens neuropsiquiátricas, tem componentes em comum, entre eles, a inflamação, o estresse oxidativo e a formação de AGEs.

Tendo em vista o papel dos astrócitos nas doenças neurodegenerativas e o potencial dos ácidos graxos saturados de cadeia longa em desencadear e propagar respostas inflamatórias no cérebro, no capítulo I da presente tese revisamos a literatura sobre o tema. Além disso, no capítulo II caracterizamos os efeitos de diferentes ácidos graxos saturados de cadeia longa nos estados inflamatório e redox de cultura primária de astrócitos.

Como analisado no capítulo I, a obesidade causa danos a fisiologia e funções cerebrais, levando a déficit cognitivo e, conseqüentemente, a doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, os astrócitos se destacam, pois a obesidade desregula funções gliais que resultam em danos neuronais. Um aspecto que tem chamado a atenção é o caráter neuroinflamatório de muitas doenças. Além disso, foi estabelecido que a inflamação em tecidos periféricos e centrais é um aspecto chave na obesidade e poderia estar relacionada a problemas cerebrais observados nessa condição. Foi sugerido que o alto índice de massa corporal está associado a menor integridade estrutural em regiões do cérebro que podem preceder a disfunção cognitiva (BOLZENIUS et al., 2015), também há indicações de que indivíduos obesos tenham volumes cerebrais totais menores, especificamente, o volume total de matéria cinzenta (BROOKS et al., 2013, JANOWITZ et al., 2015). Também existem relatos de déficit na aprendizagem, memória

e função executiva em indivíduos obesos em comparação com indivíduos não obesos (ELIAS et al., 2003, XU et al., 2011, WHITMER et al., 2005); e alguns estudos apontam que a perda de peso pode levar a uma melhora nesses aspectos cognitivos (SIERVO et al., 2011, VERONESE et al., 2017).

O cérebro é sensível a mediadores inflamatórios. Foi relatado que as citocinas causam efeitos negativos na cognição e na homeostase neuronal e as células gliais residentes no sistema nervoso central, como os astrócitos, são fontes relevantes de citocinas implicadas em doenças neurodegenerativas (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017, SALVADOR; DE LIMA; KIPNIS, 2021). Estudos indicam que ácidos graxos saturados, principalmente os de cadeia longa, são capazes de desencadear respostas inflamatórias em diferentes células e tecidos, além disso, recentemente foi sugerido que essas moléculas estão relacionadas a progressão e ao desenvolvimento de desordens no sistema nervoso central (BOGIE et al., 2020).

O cérebro é rico em ácidos graxos insaturados e colesterol (DIETSCHY; TURLEY, 2004) e é muito ativo na síntese de lipídios (EDMOND, 2001). Os ácidos graxos atravessam a barreira hematoencefálica principalmente por difusão simples na forma não ligada, mas também podem ser absorvidos pela captação direta de partículas de lipoproteína mediada por seus receptores (DHOPEHWARKAR; MEAD, 1973, MILLER; GNAEDINGER; RAPOPORT, 1987, SMITH; NAGURA, 2001, QI; HALL; DECKELBAUM, 2002, OUELLET et al., 2009). Ainda, as concentrações relativas de ácidos graxos no sangue podem influenciar o grau de sua própria infiltração no sistema nervoso central (CURI, 2002). Foi observado que os ácidos graxos saturados administrados periféricamente são captados pelo cérebro e se acumulam principalmente nos astrócitos, em comparação com os neurônios (MORAND; BAUMANN; BOURRE, 1979, BERNOUD et al., 1998).

Dessa forma, no capítulo I, verificamos que os ácidos graxos saturados de cadeia longa provenientes da dieta ou do próprio metabolismo podem ser uma das causas da inflamação crônica de baixo grau observada na obesidade. No entanto, não estão claros os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos ativariam as vias inflamatórias, apesar de haverem indícios de participação do receptor TLR4, além disso, a indução da secreção de TNF- $\alpha$  parece ser um aspecto-chave.

Continuamos analisando os efeitos dos ácidos graxos saturados de cadeia longa nos astrócitos através da incubação dos ácidos mirístico, palmítico e esteárico em culturas primárias de astrócitos. No capítulo II, encontramos um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  nos astrócitos incubados com 75  $\mu$ M dos ácidos graxos saturados, no entanto, entre eles, apenas o ácido palmítico induziu um aumento na secreção de S100B a partir de 50  $\mu$ M. Adicionalmente, observamos que o ácido palmítico causou um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  pelos astrócitos a partir de 50  $\mu$ M, além de aumentar a translocação nuclear do fator nuclear kappa B em 75  $\mu$ M. Esse resultado é bastante interessante, pois o ácido palmítico é o ácido graxo mais comum na maioria das dietas (KIEN et al., 2013) e o primeiro ácido graxo a ser formado na síntese endógena de ácidos graxos. Esse foi o primeiro relato do ácido palmítico aumentando a secreção de S100B e foi um efeito exclusivo desse ácido graxo. Além disso, a S100B tem sido descrita como um marcador molecular de dano cerebral em diferentes situações agudas ou crônicas. Muitos estudos têm considerado o aumento dos níveis de S100B como um componente da resposta neuroinflamatória, principalmente em doenças neurodegenerativas. Desse modo, a entrada de maiores quantidades de ácido palmítico no cérebro poderia contribuir para o aumento da concentração de S100B observada nessas situações de dano.

Esses resultados também trazem à tona a discussão da relação entre as secreções de S100B e TNF- $\alpha$ . Evidências sugerem de que o aumento de citocinas, como interleucina-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , pode causar diretamente um aumento na secreção de S100B como componente da

resposta neuroinflamatória (DE SOUZA et al., 2009, EDWARDS; ROBINSON, 2006, VIZUETE et al., 2021). No entanto, nas condições testadas aqui, não existem sinais de que a secreção de S100B tenha sido causada em resposta à secreção de TNF- $\alpha$ , tendo em vista que ambos só se elevaram juntos na incubação com ácido palmítico e que o ácido esteárico, que causou a maior elevação de TNF- $\alpha$ , não ocasionou alteração de S100B.

Outro ponto interessante de ser comentado, é que a secreção de TNF- $\alpha$  ou S100B se deu de maneira independente de sinais de alterações de estado redox ou de viabilidade celular. Nossos dados reforçam a sensibilidade do cérebro aos ácidos graxos saturados de cadeia longa, corroborando que essas moléculas podem estar relacionadas às disfunções cerebrais encontradas na obesidade e destacam o papel dos astrócitos nisso.

Uma das intenções do capítulo II era padronizar o modelo de dano inflamatório com ácidos graxos saturados de cadeia longa em astrócitos. Os resultados obtidos foram extremamente relevantes e trazem novas informações para o entendimento da ação dos ácidos graxos saturados de cadeia longa no sistema nervoso central, especialmente no que diz respeito a especificidade de efeito, relacionando a estrutura com a ação. Apesar disso, não foi encontrada ampla variedade de alterações que seriam importantes para o estudo de potenciais moléculas protetoras ao insulto proposto. Acreditamos que isso possa ser devido a uma limitação do modelo experimental utilizado, que impede exposições mais crônicas. Assim como a estrutura dos ácidos graxos de cadeia longa tem relação com sua toxicidade, imaginamos que o tempo de contato com as células seja outro fator crítico, uma vez que as condições nas quais eles estão elevados *in vivo*, usualmente, são crônicas.

Diante do exposto, optou-se por modificar o modelo de insulto, mimetizando características envolvidas nas doenças neurodegenerativas através da utilização de compostos com efeitos melhor descritos na literatura para o capítulo III da presente tese, com o objetivo

de verificar um possível efeito protetor do cinamaldeído ou do NaB nessas condições. Os modelos escolhidos foram incubação com LPS para modelo de inflamação, com peróxido de hidrogênio para modelo de estresse oxidativo, e com metilglioxal para modelo de glicação. Todavia, antes de iniciar a investigação dos efeitos de cinamaldeído ou de NaB nessas diferentes situações de dano, o efeito *per se* dessas moléculas foi analisado nas culturas de astrócitos. Poucos estudos avaliaram a incubação dessas moléculas em astrócitos, sendo assim, essa etapa foi fundamental para avaliar possíveis toxicidades, caracterizar seus efeitos nessas células, bem como determinar a melhor concentração de uso desses compostos.

O capítulo III iniciou com o modelo experimental I, onde foram realizadas curvas de concentração de cinamaldeído ou de NaB nas culturas de astrócitos para verificar possíveis toxicidades, caracterizar seus efeitos e verificar sua capacidade de modular proteínas isoladamente.

Inicialmente, avaliamos diferentes parâmetros de viabilidade e integridade celular com o intuito de verificar se os compostos estudados poderiam ter efeitos tóxicos nas células astrocíticas. A análise de redução de MTT, de incorporação do corante vermelho neutro e de iodeto de propídio não demonstrou efeitos danosos das diferentes concentrações de cinamaldeído ou de NaB. Por outro lado, observamos um aumento na atividade extracelular de LDH nos astrócitos incubados com 200  $\mu$ M de cinamaldeído, o que poderia indicar uma possível perda de integridade de membrana nesses astrócitos, visto que a LDH é uma enzima é exclusivamente intracelular. É importante ressaltar, que não houve alterações nas demais análises de viabilidade e integridade celular nos astrócitos adicionados com 200  $\mu$ M de cinamaldeído. Dessa forma, não é possível afirmar se esse resultado é ocasionado por morte celular ou se é um efeito do cinamaldeído na atividade enzimática da LDH. Apesar da

concentração de 200  $\mu\text{M}$  ser potencialmente tóxica, todas as concentrações foram mantidas nas demais análises.

Os resultados mais expressivos do cinamaldeído foram em relação ao conteúdo de GSH e à captação de glicose. Observamos que o cinamaldeído aumentou o conteúdo de GSH de maneira dependente da dose. De maneira semelhante, um trabalho em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide mostrou efeitos do cinamaldeído, mesmo em concentrações menores (de 10 a 40  $\mu\text{M}$ ), aumentando o conteúdo de GSH de maneira dependente da dose e diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (MATEEN et al., 2019). Além disso, foi relatado que o cinamaldeído ativa o Nrf2 (WANG et al., 2015, KIM et al., 2020), fator de transcrição importante na regulação do sistema celular de defesa antioxidante. Em conjunto, esses resultados apontam um potencial efeito antioxidante do cinamaldeído bastante interessante.

De acordo com a literatura disponível, os efeitos mais importantes do cinamaldeído parecem ser relacionados ao metabolismo da glicose, se estendendo desde sua digestão, absorção, captação e até seu armazenamento (RANASINGHE et al., 2012). Além disso, estudos apontam a canela e o cinamaldeído com potencial significativo para aumentar a captação de glicose via transportador de glicose 4 (GLUT4) e ambos têm sido considerados promissores para o uso no tratamento do diabetes mellitus e desordens associadas (NIKZAMIR et al., 2014, ZHU et al., 2017, SANTOS; DA SILVA, 2018). No entanto, observamos uma diminuição da captação de glicose em todas as concentrações testadas de cinamaldeído. Esse resultado foi inesperado, porém deve-se considerar que além de possuir predominantemente um tipo diferente de transportador de glicose, o GLUT1, o astrócito metaboliza a glicose principalmente pela via glicolítica produzindo lactato, que pode ser secretado e subsequentemente captado por neurônios e utilizado para produção de ATP, em situações fisiológicas (VERKHRATSKY;

NEDERGAARD, 2018). Porém, os astrócitos podem modificar seu metabolismo diante da situação a qual são expostos. Foi observado, que em situações pró-inflamatórias, os astrócitos captam mais glicose e seu metabolismo se torna mais glicolítico (VIZUETE et al., 2022, AFRIDI et al., 2020); nessas condições, com o aumento da via glicolítica, pode haver elevação na concentração de metilglioxal e, conseqüentemente, de AGEs, além de estresse oxidativo que podem contribuir nos processos patogênicos. Em vista disso, o cinamaldeído mostrou um comportamento oposto ao LPS, diminuindo a captação de glicose. Desta forma, supomos que, nessa condição, os astrócitos se tornariam mais oxidativos, ativando mais o ciclo do ácido tricarboxílico para manter a concentração de ATP.

Assim, podemos inferir que a exposição ao cinamaldeído poderia atuar aumentando a eficiência na utilização da glicose, de maneira que o astrócito necessitaria de menor captação dessa molécula. Por outro lado, foi observado que a canela pode estimular a atividade da fosfofrutocinase-1 (YAGHMOOR; KHOJA, 2011) e que o próprio cinamaldeído aumentaria a atividade da piruvato cinase (ANAND et al., 2010), no fígado de ratos com modelo de diabetes; trazendo à tona o potencial do cinamaldeído para tratar essa condição. Dessa maneira, o cinamaldeído poderia agir de maneira oposta, porém complementar nos tecidos centrais e periféricos. Enquanto nos tecidos periféricos, o cinamaldeído estimularia a captação de glicose e metabolização por via glicolítica, no cérebro ele poderia inibir a captação de glicose e estimular a glicólise oxidativa; ambas vias interessantes de serem estimuladas para o tratamento de diabetes mellitus. No entanto, mais estudos são necessários para determinar se o cinamaldeído realmente está estimulando a glicólise oxidativa nos astrócitos e como ele age em outras células cerebrais.

A concentração de 100  $\mu$ M de cinamaldeído ocasionou a diminuição na atividade da enzima GS e o aumento no imunocontéudo de GFAP. Essa foi a primeira vez que foi observado

o efeito do cinamaldeído sobre a atividade de GS. Na ausência de outros trabalhos para dar suporte, podemos inferir que, o glutamato intracelular estaria sendo direcionado principalmente para a síntese de GSH, já que observamos um aumento no seu conteúdo, e menos encaminhado para a síntese de glutamina. No entanto, as outras concentrações de cinamaldeído também aumentaram o conteúdo de GSH, sem alterar a atividade de GS; demonstrado que esse efeito em diminuir a atividade de GS foi específico para 100  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído.

O aumento no conteúdo de GFAP também foi observado nos astrócitos incubados com 100  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído. A avaliação *in vitro* do efeito direto do cinamaldeído no conteúdo de GFAP não foi realizada por outros trabalhos. Dois trabalhos avaliaram que a canela prevenia o aumento da GFAP no hipocampo (ALMOHAI MEED et al., 2021) e na retina (KOMMULA et al., 2020) de ratos com modelo de diabetes induzido por estreptozotocina. Apesar do aumento de GFAP ser reconhecido como um marcador de astrogliose, sabe-se que essa proteína também é modulada por atividade física e exposição a ambientes enriquecidos, indicando uma ativação glial (revisado em ESCARTIN et al., 2021). Portanto, alterações na expressão da GFAP também podem indicar plasticidade adaptativa fisiológica e não somente apontar uma resposta reativa a insultos patológicos.

Por outro lado, a incubação de 200  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído nas culturas de astrócitos diminuiu a captação de glutamato e a secreção da proteína S100B. Visto que essa concentração aumentou a atividade extracelular de LDH, esse resultado sugere um prejuízo no metabolismo glutamatérgico e possível efeito tóxico, uma vez que uma redução da captação de glutamato poderia implicar em uma maior concentração extracelular desse neurotransmissor, que pode levar à excitotoxicidade. Essa foi a primeira vez que se observou que o cinamaldeído diminuiu a secreção de S100B em astrócitos. Um estudo em linhagem de astrócitos C6 observou que as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  de extrato aquoso de canela rico em polifenóis aumentava a

secreção e o conteúdo de S100B em 4 e 24 horas (QIN; PANICKAR; ANDERSON, 2014). Nesse contexto, consideramos que esses resultados demonstram que a incubação de 200  $\mu\text{M}$  de cinamaldeído pode estar apresentando um mecanismo tóxico inicial nos astrócitos.

Considerando os resultados obtidos, a concentração de cinamaldeído escolhida para as etapas seguintes foi 100  $\mu\text{M}$ , uma vez que, além de não ser tóxica, aumentou o conteúdo de GSH dos astrócitos.

Os efeitos da incubação de NaB também foram avaliados nas culturas primárias de astrócitos em diferentes concentrações. Encontramos um aumento no imunoc conteúdo da proteína S100B nas células incubadas com 100  $\mu\text{M}$  de NaB. Esse foi um resultado interessante, dadas as importantes funções intracelulares dessa proteína. É pertinente ressaltar, que as concentrações mais altas de NaB não causaram essa alteração. Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito do NaB sobre a S100B.

A concentração de 250  $\mu\text{M}$  de NaB aumentou a atividade de GS nos astrócitos, um dado inédito na literatura. Esse foi um efeito intrigante, pois o NaB é um metabólito do cinamaldeído e causou um efeito antagônico em relação à atividade de GS. É pertinente ressaltar que o NaB é utilizado para tratar hiperamonemia em desordens do ciclo da ureia e em encefalopatia hepática (MISEL et al., 2013). O NaB se conjuga à glicina formando hipurato, que pode ser eliminado pelos rins, dessa forma diminuindo os níveis de amônia de maneira independente ao ciclo da ureia (HUSSON et al., 2016). Aqui, mostramos uma possível via de interesse no tratamento de indivíduos com excesso de amônia ou glutamato no cérebro, pois o aumento da atividade de GS nos astrócitos acarreta em maior consumo de glutamato e de amônia livre, convertendo-os em glutamina, uma forma não tóxica de circulação do nitrogênio e auxiliando na prevenção de excitotoxicidade glutamatérgica.

Isto posto, podemos concluir que o cinamaldeído parece ter mais efeitos *per se* em astrócitos do que o seu metabólito NaB. Além disso, os efeitos dos dois compostos são diferentes. É importante ressaltar, que mesmo sem efeitos contundentes *per se*, pois, cada efeito foi observado em uma concentração específica, não significa que o NaB não poderia ser protetor em situações de dano. Em vista disso, a concentração de 250  $\mu\text{M}$  foi a escolhida para o seguimento de nossa investigação, por ser uma concentração intermediária e que aumentou a atividade de GS, além de não ter causado efeitos tóxicos nos astrócitos.

Após a escolha das concentrações de uso de cinamaldeído e de NaB, seguimos com o intuito de verificar se essas moléculas poderiam proteger os astrócitos de insultos que mimetizam condições relacionadas às doenças neurodegenerativas. Para isso, foram utilizados LPS, peróxido de hidrogênio e metilglioxal como modelos para estudar inflamação, dano oxidativo e dano glicante, respectivamente, características comuns em diversas condições neurodegenerativas.

Foi descrito que o TNF- $\alpha$  é uma citocina relacionada às complicações da neuroinflamação em doenças neurodegenerativas (RAUF et al., 2022). Nós observamos que o cinamaldeído ou o NaB foram capazes de prevenir o aumento de secreção de TNF- $\alpha$  induzido pelo LPS. Esse resultado foi bastante intrigante, pois mesmo o NaB, que causou poucos efeitos *per se*, foi capaz de evitar o aumento na secreção de TNF- $\alpha$ . Além disso, a secreção de TNF- $\alpha$  nos astrócitos incubados com cinamaldeído e LPS foi ainda menor do que no controle. Anteriormente, um estudo que analisou 115 alimentos demonstrou que o *Cinnamomum zeylanicum* tinha uma das maiores atividades anti-inflamatórias (GUNAWARDENA et al., 2014). Desse modo, as propriedades anti-inflamatórias da canela têm sido exploradas (ZHU et al., 2020) e têm sido relacionadas principalmente ao seu conteúdo de cinamaldeído (CHEN et al., 2016, GUNAWARDENA et al., 2015). O NaB também já demonstrou prevenir o aumento

de citocinas induzido por LPS em células microgliciais (BRAHMACHARI; JANA; PAHAN, 2009). Desse modo, especialmente o cinamaldeído, mas também o NaB, parecem ter potenciais efeitos anti-inflamatórios promissores.

É pertinente comentar que, o LPS é um modelo estabelecido e amplamente utilizado para estudos sobre inflamação. No entanto, enquanto o LPS aumentou cerca de 1,5 vezes em relação ao veículo a secreção de TNF- $\alpha$ , o ácido mirístico aumentou mais de 3 vezes, o ácido palmítico aproximadamente 2,5 vezes e o ácido esteárico aumentou 4 vezes a liberação dessa citocina pelos astrócitos. Esse é um resultado bastante interessante, sobretudo porque hoje é discutido se os ácidos graxos saturados ligam ou não no mesmo receptor que o LPS, o TLR4. Por outro lado, a ação do LPS via TLR4 é bem conhecida, assim como as vias que ativa após sua ligação com o receptor, favorecendo o estudo de compostos que modulem essas vias. Portanto, mais estudos são necessários para entender em qual receptor os ácidos graxos saturados ligam e quais vias ativam após essa ligação, conforme discutido nos capítulos I e II.

O estresse oxidativo tem sido associado a diversas doenças e é sugerido que está envolvido no surgimento e na progressão de distúrbios neurodegenerativos. Os efeitos que observamos com a incubação de peróxido de hidrogênio nas culturas primárias de astrócitos foram bastantes intrigantes. Por um lado, não observamos alterações nas incorporações do corante vermelho neutro ou de iodeto de propídio ou, ainda, na redução de MTT. Por outro lado, observamos um aumento na atividade extracelular de LDH nos astrócitos incubados com peróxido de hidrogênio, a qual foi prevenida pela incubação de cinamaldeído. Nessas condições, o cinamaldeído se mostrou mais promissor do que o NaB em relação ao dano oxidativo nos astrócitos.

Além disso, a diminuição na atividade da enzima GS ocasionada pela adição de peróxido de hidrogênio foi evitada pela incubação de cinamaldeído ou de NaB. Esse efeito foi bastante

interessante, pois a incubação *per se* dessas moléculas ocasionou efeitos opostos na atividade dessa enzima. Enquanto o cinamaldeído diminuiu, o NaB aumentou a atividade de GS. E, de maneira intrigante, perante a incubação de peróxido de hidrogênio, tanto o cinamaldeído quanto o NaB evitaram a diminuição da atividade enzimática de GS.

Apesar do aumento na atividade extracelular de LDH ocasionado pela adição de peróxido de hidrogênio, não supomos que haja uma grande alteração de viabilidade ou integridade celular, já que para os outros parâmetros relacionados não foram encontradas alterações. É importante ressaltar que os astrócitos expostos ao peróxido de hidrogênio mantiveram sua atividade de GS, mesmo que diminuída, não sugerindo uma morte celular expressiva. Além disso, na linhagem de astrócitos C6, a mesma concentração de peróxido de hidrogênio pelo mesmo tempo que utilizamos aqui não alterou a redução de MTT, a atividade de LDH ou a incorporação de iodeto de propídio (QUINCOZES-SANTOS et al., 2009, QUINCOZES-SANTOS et al., 2010). É relevante notar, que as células C6 tem origem tumoral e seu metabolismo glicolítico pode ser diferente dos astrócitos de cultura primária, porém é sugerido que as células C6 respondem de maneira semelhante às culturas primárias à adição de peróxido de hidrogênio para a atividade de GS e o conteúdo de GSH (GALLAND et al., 2019). Corroborando, assim, a hipótese de que nossas células não estariam com amplo comprometimento viabilidade celular.

Nesse sentido, sabe-se que o peróxido de hidrogênio é uma molécula de sinalização redox importante e as reações redox são profundamente ligadas ao metabolismo energético. O peróxido de hidrogênio atua na regulação da sinalização celular e expressão gênica, além de modular fatores de transcrição e vias metabólicas celulares. Além disso, o peróxido de hidrogênio também pode modificar covalentemente proteínas, incluindo fosfatases e cinases, enzimas metabólicas, fatores de transcrição, canais iônicos e proteínas estruturais, o que pode

ter diversas implicações no metabolismo celular (THOMAS; WITTING; DRUMMOND, 2008, BRETÓN-ROMERO; LAMAS, 2014, LENNICKE; COCHEMÉ, 2021). Os efeitos intracelulares do peróxido de hidrogênio podem ser explicados por mudanças na relação tiol:dissulfeto celular, importante determinante do estado redox da célula (CADENAS; PACKER, 2013). Também já se observou que, mesmo em baixas doses, o peróxido de hidrogênio reduz a secreção de insulina induzida pela glicose através da inibição do metabolismo da glicose (REBELATO et al., 2010). Sendo assim, nossos resultados de aumento de atividade de LDH pela incubação de peróxido de hidrogênio poderiam ser ocasionados por alterações no metabolismo celular. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa confirmar essa hipótese.

Os astrócitos adicionados de peróxido de hidrogênio também tiveram menor conteúdo de GSH e, ainda que o cinamaldeído tenha aumentado a GSH *per se*, esse dano induzido por peróxido não foi prevenido por cinamaldeído ou NaB. Além disso, a incubação de peróxido de hidrogênio nos astrócitos ocasionou uma diminuição expressiva na captação de glutamato, que não foi prevenida pela incubação de cinamaldeído ou NaB. Esse resultado poderia ser indicativo de que os transportadores de glutamato estariam oxidados, pois se sabe que a captação de glutamato é reduzida em condições de oxidação, como na presença de peróxido de hidrogênio, e que os transportadores de glutamato são sensíveis à oxidação (VOLTERRA et al., 1994, TROTTI et al., 1997, ZAGAMI et al., 2005).

As diminuições de conteúdo de GSH e de captação de glutamato demonstram um efeito oxidante direto do peróxido de hidrogênio, porém o cinamaldeído ou o NaB não agiram como antioxidantes nessas condições. Por outro lado, o aumento de atividade de LDH foi prevenido pelo cinamaldeído. Dessa maneira, o efeito na atividade de LDH pode não ter origem em uma atividade antioxidante do cinamaldeído, mas poderia ser consequência de sua atividade no

metabolismo energético. No entanto, é necessário que mais estudos sejam feitos para compreender se o cinamaldeído está agindo no metabolismo energético nessas condições e se nossos resultados reforçam essa hipótese.

O processo de glicação e formação de AGEs têm sido alvo de estudos devido às evidências de seu envolvimento em diversos processos fisiopatológicos, entre eles as doenças neurodegenerativas. Encontramos um aumento na captação de glicose nos astrócitos incubados com metilglioxal. Podemos supor que, o metilglioxal provoque uma demanda aumentada por glicose devido a formação intracelular irreversível de AGEs, deixando a glicose intracelular indisponível para o metabolismo astrocítico, levando, assim, a maior necessidade de captação dessa molécula. Esse aumento na captação de glicose ocasionado pela adição de metilglioxal foi prevenido nos astrócitos incubados com cinamaldeído ou NaB. Curiosamente, o NaB *per se* não alterou a captação de glicose, enquanto o cinamaldeído a diminuiu significativamente, mesmo na incubação com 50  $\mu$ M; por outro lado, perante o insulto com metilglioxal, tanto o cinamaldeído quanto o NaB evitaram o aumento dessa captação na mesma extensão.

Também observamos uma diminuição da secreção de S100B provocada pelo metilglioxal nas culturas de astrócitos. Corroborando com esse resultado, em fatias agudas de hipocampo, a mesma dose de metilglioxal por 60 minutos também diminuiu a secreção de S100B; os autores realizaram a co-incubação com três concentrações de aminoguanidina, um composto antiglicação, e com L-lisina, um substrato competitivo para a glicação proteica do metilglioxal, porém nenhuma delas foi capaz de impedir essa redução de S100B (HANSEN et al., 2016). Temos de ressaltar aqui a relevância do efeito que encontramos, onde a diminuição da secreção de S100B ocasionada pelo metilglioxal foi prevenida tanto pela incubação de cinamaldeído quanto de NaB, sem alterar o conteúdo intracelular dessa proteína.

Uma vez que o modelo experimental utilizado com os ácidos graxos saturados de cadeia longa não foi capaz de mimetizar todas as características tóxicas observadas nas condições *in vivo*, utilizamos outros modelos de dano estabelecidos na literatura para a seguinte parte de nosso trabalho. Dessa forma, foi possível analisar se o cinamaldeído ou o NaB tinham efeitos preventivos em danos ocasionados em uma variedade maior de vias. Por outro lado, é interessante ressaltar que, as doses utilizadas dos ácidos graxos são semelhantes ou menores do que suas concentrações plasmáticas encontrada em situações homeostáticas (ABDELMAGID et al., 2015), além do fato de que circunstâncias como exercício, jejum, dieta, entre outros fatores (HENDERSON, 2021), podem aumentar essas concentrações. Por isso, ressaltamos a relevância fisiológica dos resultados do Capítulo II. Desse modo, é interessante que mais estudos sejam feitos para avaliar a relação *in vivo* dos ácidos graxos saturados de cadeia longa com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas à obesidade.

Em relação ao potencial efeito protetor de cinamaldeído ou de NaB, ambos se mostraram promissores para prevenir os diferentes aspectos relacionados às doenças neurodegenerativas testados, tendo efeitos em vias de inflamação, de dano oxidativo e glicante. Porém é necessário que se realizem mais análises para verificar as vias em que esses compostos provenientes da canela estão atuando e seus efeitos *in vivo*, para entender se seu uso realmente pode trazer benefícios em relação às doenças neurodegenerativas.

Devemos ressaltar que, esse trabalho foi realizado em astrócitos em cultura, ausentes da comunicação tridimensional com outros tipos celulares e das interações que ocorrem *in vivo*. Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão da extensão dos efeitos de cinamaldeído e de NaB nas doenças neurodegenerativas.

## 8. CONCLUSÕES

Nossos resultados e análises corroboram que os ácidos graxos saturados alteram a homeostase dos astrócitos, assim, eles poderiam contribuir para o início ou a progressão do processo neuroinflamatório atuando nas alterações do sistema nervoso central observadas em doenças neurodegenerativas, principalmente relacionadas à obesidade. Além disso, salientamos que em situações nas quais o ácido palmítico está em maior concentração na circulação e há dano à barreira hematoencefálica, esse ácido graxo poderia mediar alguns dos efeitos prejudiciais observados no cérebro, através do aumento da secreção de S100B, molécula que tem sido implicada na patogênese de doenças neurodegenerativas. Também destacamos que os ácidos graxos saturados da dieta ou do próprio metabolismo podem ser uma das causas da inflamação crônica de baixo grau encontrada na obesidade, pois podem desencadear a liberação de TNF- $\alpha$  no cérebro, que pode ativar respostas inflamatórias no corpo.

Também podemos concluir que tanto o cinamaldeído quanto o NaB modulam diferentes funções astrocíticas nas condições testadas, sendo que a incubação de cinamaldeído apresentou mais efeitos *per se* nas células. Além disso, ambos compostos se mostraram promissores frente aos insultos inflamatório e glicante, porém, o cinamaldeído demonstrou maior potencial perante o insulto oxidante. Em vista disso, podemos concluir que tanto o cinamaldeído quanto o NaB demonstram-se moléculas promissoras na modulação de funções astrocíticas em diferentes situações, com destaque para os mecanismos relacionados às doenças neurodegenerativas.

Dessa forma, podemos concluir que os ácidos graxos saturados de cadeia longa podem participar da patogênese das doenças neuroinflamatórias e que essa ação é dependente da estrutura dos ácidos graxos. Ainda, os compostos bioativos cinamaldeído e NaB, além de terem

efeitos sobre o metabolismo basal cerebral, são moléculas promissoras para o tratamento e prevenção de características frequentemente encontradas nessas patologias.

## 9. PERSPECTIVAS

### 9.1. PARA FINALIZAR O ARTIGO DO CAPÍTULO I

O artigo do capítulo I passará por revisão da escrita. Ainda, será adicionada uma figura com o possível mecanismo de ação inflamatória dos ácidos graxos saturados de cadeia longa nos astrócitos.

### 9.2. PARA FINALIZAR OS DADOS DO CAPÍTULO III

Os resultados dos modelos experimentais de 1 a 4 descritos no capítulo III serão concluídos com os seguintes experimentos para a finalização e submissão do terceiro artigo:

- Modelo Experimental 2: Efeitos de cinamaldeído ou de NaB frente a insulto induzido por LPS em astrócitos: Avaliar a expressão de ciclooxigenase-2 e TLR4, a secreção de interleucina-1 $\beta$ , a secreção e o imunoconteúdo de S100B, além da translocação nuclear de fator nuclear kappa B.
- Modelo Experimental 3: Efeitos de cinamaldeído ou de NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio em astrócitos: Analisar a formação de espécies reativas de oxigênio (DCFH-DA), a secreção e o imunoconteúdo de S100B, além de analisar parâmetros relacionados ao metabolismo energético (atividade de enzimas da via glicolítica) e à apoptose.

- Modelo Experimental 4: Efeitos de cinamaldeído ou de NaB frente a insulto induzido por metilglioxal em astrócitos: Medir a expressão de GLUT1, a produção de AGEs e parâmetros de metabolismo energético, como enzimas da via glicolítica.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, S. A. et al. Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116195, 12 fev. 2015.
- ABRAHAM, K. et al. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 2, p. 228–239, fev. 2010.
- AFRIDI, R. et al. Metabolic Regulation of Glial Phenotypes: Implications in Neuron–Glia Interactions and Neurological Disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, 2020.
- AHMED, N. et al. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1639, n. 2, p. 121–132, 15 out. 2003.
- ALMOHAI MEED, H. M. et al. Synergistic Anti-inflammatory and Neuroprotective Effects of Cinnamomum cassia and Zingiber officinale Alleviate Diabetes-Induced Hippocampal Changes in Male Albino Rats: Structural and Molecular Evidence. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 727049, 8 set. 2021.
- ANAND, P. et al. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 1, p. 72–81, jun. 2010.
- AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 227–238, nov. 2008.
- BANDARA, T.; ULUWADUGE, I.; JANSZ, E. R. Bioactivity of cinnamon with special emphasis on diabetes mellitus: A review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 380–386, maio 2012.
- BATISTA, C. R. A. et al. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2293, 9 maio 2019.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, jan. 2017.
- BEERI, M. S. et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 11–12, p. 583–587, 2011.
- BERNOUD, N. et al. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 9, p. 1816–1824, set. 1998.
- BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. TH. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 169–176, 1 fev. 2003.

BLANCO-SUÁREZ, E.; CALDWELL, A. L. M.; ALLEN, N. J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders: Astrocyte-synapse disease. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 6, p. 1903–1916, 15 mar. 2017.

BOGIE, J. F. J. et al. Fatty acid metabolism in the progression and resolution of CNS disorders. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 159, p. 198–213, 2020.

BOLZENIUS, J. D. et al. Brain structure and cognitive correlates of body mass index in healthy older adults. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 342–347, 1 fev. 2015.

BRAHMACHARI, S.; JANA, A.; PAHAN, K. Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Reduces Microglial and Astroglial Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5917–5927, 1 nov. 2009.

BRETÓN-ROMERO, R.; LAMAS, S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. **Redox Biology**, v. 2, p. 529–534, 2014.

BROOKS, S. J. et al. Late-life obesity is associated with smaller global and regional gray matter volumes: a voxel-based morphometric study. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 2, p. 230–236, fev. 2013.

BROWN, G. C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 180, dez. 2019.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 13 dez. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, jun. 2005.

CADENAS, E.; PACKER, L. Preface. Hydrogen peroxide and cell signaling, part A. **Methods in Enzymology**, v. 526, p. xv, 2013.

ÇELİK, R. et al. Effects of cinnamaldehyde on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, some biochemical and hematological parameters in diabetic rats. **Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals**, v. 27, n. 3, p. 270–277, maio 2022.

**CFR - Code of Federal Regulations Title 21.** Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1733>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

CHEN, Y. et al. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 3, mar. 2020.

CHEN, Y.; MA, Y.; MA, W. Pharmacokinetics and bioavailability of cinnamic acid after oral administration of ramulus cinnamomi in rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 34, n. 1, p. 51–56, mar. 2009.

CHEN, Y.-F. et al. Trans-Cinnamaldehyde, An Essential Oil in Cinnamon Powder, Ameliorates Cerebral Ischemia-Induced Brain Injury via Inhibition of Neuroinflammation Through

Attenuation of iNOS, COX-2 Expression and NFκ-B Signaling Pathway. **NeuroMolecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 322–333, set. 2016.

CHOI, Y. H. trans-Cinnamaldehyde Prevents Oxidative Stress-Induced Apoptosis in V79-4 Chinese Hamster Lung Fibroblasts through the Nrf2-Mediated HO-1 Activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 11, p. 1707–1714, 2020.

COCCHIARA, J. et al. Fragrance material review on cinnamaldehyde. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 6, p. 867–923, jun. 2005.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, set. 2001.

DE BOER, A. G.; GAILLARD, P. J. Blood–brain barrier dysfunction and recovery. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 4, p. 455–462, abr. 2006.

DE SOUZA, D. F. et al. S100B secretion is stimulated by IL-1β in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. **Journal of Neuroimmunology**, v. 206, n. 1–2, p. 52–57, jan. 2009.

DEGEN, J. et al. Metabolic transit of dietary methylglyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 43, p. 10253–10260, 30 out. 2013.

DHOPEHWARKAR, G. A.; MEAD, J. F. Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. **Advances in Lipid Research**, v. 11, n. 0, p. 109–142, 1973.

DICKSON, K.; LEHMANN, C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4341, 5 set. 2019.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 8, p. 1375–1397, ago. 2004.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, out. 2016.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637–668, jul. 2001.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 540–551, 15 abr. 2003.

DONATO, R. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, jun. 2009.

- DONATO, R. et al. Functions of S100 Proteins. v. 13, n. 1, p. 24–57, 2013.
- DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 139–156, jan. 2018.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912–4916, ago. 2000.
- EDMOND, J. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 16, n. 2–3, p. 181–193, jun. 2001.
- EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 11, p. 1709–1715, 9 nov. 2006.
- ELIAS, M. F. et al. Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 27, n. 2, p. 260–268, fev. 2003.
- ESCARTIN, C. et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 312–325, mar. 2021.
- FRITSCHKE, K. L. The science of fatty acids and inflammation. **Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 3, p. 293S-301S, maio 2015.
- GALLAND, F. et al. Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. **Neurochemistry International**, v. 131, p. 104538, dez. 2019.
- GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT. **High daily intakes of cinnamon - Health risk cannot be ruled out.** [s.l.] Zenodo, 26 set. 2006. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/580882>>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- GLOMB, M. A.; MONNIER, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 17, p. 10017–10026, 28 abr. 1995.
- GONÇALVES, C.-A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, jul. 2008.
- GONZÁLEZ-REYES, R. E. et al. Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 427, 19 dez. 2017.
- GOTTFRIED, C. et al. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, n. 10, p. 1333–1340, jul. 2002.

GROPMAN, A. L.; SUMMAR, M.; LEONARD, J. V. Neurological implications of urea cycle disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 6, p. 865–879, nov. 2007.

GUILLEMOT-LEGRIS, O. et al. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 206, dez. 2016.

GULEC PEKER, E. G.; KALTALIOGLU, K. Cinnamaldehyde and eugenol protect against LPS-stimulated oxidative stress and inflammation in Raw 264.7 cells. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. e13980, dez. 2021.

GUNAWARDENA, D. et al. Determination of anti-inflammatory activities of standardised preparations of plant- and mushroom-based foods. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 335–343, fev. 2014.

GUNAWARDENA, D. et al. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts – identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 910–919, 2015.

GUPTA, S. et al. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes: Fatty acids and glial inflammation. **Journal of Neurochemistry**, p. no-no, fev. 2012.

HADJIHAMBHI, A. et al. The effect of general anaesthetics on brain lactate release. **European Journal of Pharmacology**, v. 881, p. 173188, ago. 2020.

HAIK, G. M.; LO, T. W.; THORNALLEY, P. J. Methylglyoxal concentration and glyoxalase activities in the human lens. **Experimental Eye Research**, v. 59, n. 4, p. 497–500, out. 1994.

HAJIMONFAREDNEJAD, M. et al. Cinnamon: A systematic review of adverse events. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 594–602, abr. 2019.

HAJINEJAD, M. et al. Natural Cinnamaldehyde and Its Derivatives Ameliorate Neuroinflammatory Pathways in Neurodegenerative Diseases. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–9, 14 nov. 2020.

HANSEN, F. et al. Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation. **Amino Acids**, v. 48, n. 2, p. 375–385, fev. 2016.

HASEL, P.; LIDDELOW, S. A. Astrocytes. **Current Biology**, v. 31, n. 7, p. R326–R327, abr. 2021.

HENDERSON, G. C. Plasma Free Fatty Acid Concentration as a Modifiable Risk Factor for Metabolic Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2590, 28 jul. 2021.

HUSSON, M.-C. et al. Efficacy and safety of i.v. sodium benzoate in urea cycle disorders: a multicentre retrospective study. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, n. 1, p. 127, dez. 2016.

ISLAM, MD. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, n. 1, p. 73–82, 2 jan. 2017.

- JANA, A. et al. Up-Regulation of Neurotrophic Factors by Cinnamon and its Metabolite Sodium Benzoate: Therapeutic Implications for Neurodegenerative Disorders. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 739–755, jun. 2013.
- JANOWITZ, D. et al. Association between waist circumference and gray matter volume in 2344 individuals from two adult community-based samples. **NeuroImage**, v. 122, p. 149–157, 15 nov. 2015.
- JAWALE, A. et al. Reversal of diabetes-induced behavioral and neurochemical deficits by cinnamaldehyde. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 923–930, ago. 2016.
- JEON, B. T. et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1444–1454, jun. 2012.
- KANNAPPAN, R. et al. Neuroprotection by Spice-Derived Nutraceuticals: You Are What You Eat! **Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 2, p. 142–159, out. 2011.
- KHASNAVIS, S.; PAHAN, K. Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Upregulates Neuroprotective Parkinson Disease Protein DJ-1 in Astrocytes and Neurons. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 424–435, jun. 2012.
- KHASNAVIS, S.; PAHAN, K. Cinnamon Treatment Upregulates Neuroprotective Proteins Parkin and DJ-1 and Protects Dopaminergic Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 569–581, set. 2014.
- KIEN, C. L. et al. Substituting dietary monounsaturated fat for saturated fat is associated with increased daily physical activity and resting energy expenditure and with changes in mood. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 689–697, abr. 2013.
- KIM, N. et al. Cinnamaldehyde protects against oxidative stress and inhibits the TNF- $\alpha$ -induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, 16 abr. 2020.
- KOMMULA, S. R. et al. Cinnamon Attenuated Long-Term IGT-Induced Retinal Abnormalities via Regulation of Glucose Homeostasis in Neonatal Streptozotocin Induced Rat Model. **Indian journal of clinical biochemistry: IJCB**, v. 35, n. 4, p. 442–450, out. 2020.
- KRONER, Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 14, n. 4, p. 373–379, dez. 2009.
- KWON, H. S.; KOH, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 42, 26 nov. 2020.
- LEE, H. K. et al. A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in neuroglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 1, p. 273–284, jan. 2009.
- LENNERZ, B. S. et al. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 114, n. 1, p. 73–79, jan. 2015.

LENNICKE, C.; COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, v. 81, n. 18, p. 3691–3707, set. 2021.

LOEPKE, A. W. et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. **Anesthesia and Analgesia**, v. 108, n. 1, p. 90–104, jan. 2009.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K. P.; NOREMBERG, M. D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 195, n. 4284, p. 1356–1358, 25 mar. 1977.

MASSAAD, C. A.; KLANN, E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 10, p. 2013–2054, 15 maio 2011.

MATEEN, S. et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. **European Journal of Pharmacology**, v. 852, p. 14–24, jun. 2019.

MILLER, J. C.; GNAEDINGER, J. M.; RAPOPORT, S. I. Utilization of plasma fatty acid in rat brain: distribution of [14C]palmitate between oxidative and synthetic pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1507–1514, nov. 1987.

MINET, R. et al. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 268, n. 1–2, p. 121–132, 10 dez. 1997.

MISEL, M. L. et al. Sodium benzoate for treatment of hepatic encephalopathy. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 4, p. 219–227, abr. 2013.

MODI, K. K. et al. Cinnamon and Its Metabolite Sodium Benzoate Attenuate the Activation of p21<sup>rac</sup> and Protect Memory and Learning in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0130398, 23 jun. 2015a.

MODI, K. K. et al. Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Upregulates Ciliary Neurotrophic Factor in Astrocytes and Oligodendrocytes. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 11, p. 2333–2347, nov. 2015b.

MOMTAZ, S. et al. Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 241–258, abr. 2018.

MORAND, O.; BAUMANN, N.; BOURRE, J. M. In vivo incorporation of exogenous [1-14C]stearic acid into neurons and astrocytes. **Neuroscience Letters**, v. 13, n. 2, p. 177–181, jul. 1979.

NAIR, B. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. **International Journal of Toxicology**, v. 20 Suppl 3, p. 23–50, 2001.

NEMET, I.; VARGA-DEFTERDAROVIĆ, L.; TURK, Z. Methylglyoxal in food and living organisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1105–1117, dez. 2006.

NIKZAMIR, A. et al. Expression of Glucose Transporter 4 (GLUT4) is Increased by Cinnamaldehyde in C2C12 Mouse Muscle Cells. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 2, 5 fev. 2014.

O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 3, p. 433–442, maio 2005.

OHANIAN, S. H.; SCHWAB, J. H. Persistence of group a streptococcal cell walls related to chronic inflammation of rabbit dermal connective tissue. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 125, n. 6, p. 1137–1148, 1 jun. 1967.

OTTERSEN, P.; WALBERG, F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. **Neuroscience**, v. 46, n. 3, p. 519–34, 1992.

OUELLET, M. et al. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 476–482, dez. 2009.

PAMPLONA, R. et al. Maillard reaction versus other nonenzymatic modifications in neurodegenerative processes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1126, p. 315–319, abr. 2008.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 25 out. 1994.

PHILLIPS, S. A.; THORNALLEY, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, n. 1, p. 101–105, 15 fev. 1993.

PINTO, S. S. et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS Letters**, v. 486, n. 3, p. 203–207, 15 dez. 2000.

PISTELL, P. J. et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 219, n. 1–2, p. 25–32, 26 fev. 2010.

PLÓCIENNIKOWSKA, A. et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 3, p. 557–581, fev. 2015.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1163–1182, maio 2004.

POMPLIANO, D. L.; PEYMAN, A.; KNOWLES, J. R. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. **Biochemistry**, v. 29, n. 13, p. 3186–3194, 3 abr. 1990.

PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1037–1045, maio 2017.

QI, K.; HALL, M.; DECKELBAUM, R. J. Long-chain polyunsaturated fatty acid accretion in brain. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 2, p. 133–138, mar. 2002.

QIN, B.; PANICKAR, K. S.; ANDERSON, R. A. Cinnamon polyphenols regulate S100 $\beta$ , sirtuins, and neuroactive proteins in rat C6 glioma cells. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 210–217, fev. 2014.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. The janus face of resveratrol in astroglial cells. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 1, p. 30–41, jul. 2009.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 3, p. 916–920, abr. 2010.

RAMALINGAM, M.; KIM, S.-J. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca<sup>2+</sup> and Akt/Bcl-2 signaling pathways. **Free Radical Research**, v. 48, n. 3, p. 347–356, mar. 2014.

RANASINGHE, P. et al. Efficacy and safety of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis: Efficacy and safety of ‘true’ cinnamon in diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 12, p. 1480–1492, dez. 2012.

RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of ‘true’ cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 275, dez. 2013.

RANGASAMY, S. B. et al. Stimulation of Dopamine Production by Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive. **Journal of Alzheimer’s Disease Reports**, v. 5, n. 1, p. 295–310, 23 abr. 2021a.

RANGASAMY, S. B. et al. Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive, Improves Cognitive Functions in Mice after Controlled Cortical Impact Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 192, 24 dez. 2021b.

RAO, P. V.; GAN, S. H. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

RAUF, A. et al. Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 10, p. 3194, 17 maio 2022.

REBELATO, E. et al. Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. **Metabolism**, v. 59, n. 3, p. 409–413, mar. 2010.

RICHARD, J. P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 2, p. 549–553, maio 1993.

ROSA NETO, J. C. et al. The Immunometabolic Roles of Various Fatty Acids in Macrophages and Lymphocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8460, 6 ago. 2021.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 614–632, 15 abr. 2003.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, jan. 2017.

SALVADOR, A. F.; DE LIMA, K. A.; KIPNIS, J. Neuromodulation by the immune system: a focus on cytokines. **Nature Reviews. Immunology**, v. 21, n. 8, p. 526–541, ago. 2021.

SANTOS, H. O.; DA SILVA, G. A. R. To what extent does cinnamon administration improve the glycemic and lipid profiles? **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 27, p. 1–9, out. 2018.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 1, p. 407–461, 1 jan. 2020.

SCHIWECK, J.; EICKHOLT, B. J.; MURK, K. Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 261, 21 ago. 2018.

SCHUCK, P. F. et al. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 2, p. 277–288, fev. 2007.

SEN, J.; BELLI, A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 7, p. 1373–1380, 15 maio 2007.

SHEN, C.-Y. et al. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5591, 27 nov. 2020.

SHREAZ, S. et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116–131, jul. 2016.

SIERVO, M. et al. Intentional weight loss in overweight and obese individuals and cognitive function: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 12, n. 11, p. 968–983, nov. 2011.

SMITH, Q. R.; NAGURA, H. Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 16, n. 2–3, p. 167–172, jun. 2001.

SRIKANTH, V. et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 5, p. 763–777, maio 2011.

STOKES, J. et al. Mechanisms underlying neonate-specific metabolic effects of volatile anesthetics. **eLife**, v. 10, p. e65400, 13 jul. 2021.

SUBASH BABU, P.; PRABUSEENIVASAN, S.; IGNACIMUTHU, S. Cinnamaldehyde—A potential antidiabetic agent. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 15–22, jan. 2007.

- TAKATA, F. et al. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 661838, 13 set. 2021.
- TELEANU, D. M. et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5938, 25 maio 2022.
- THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; DRUMMOND, G. R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 10, p. 1713–1765, out. 2008.
- THORNALLEY, P. J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. **The Biochemical Journal**, v. 254, n. 3, p. 751–755, 15 set. 1988.
- THORNALLEY, P. J. The glyoxalase system in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 14, n. 4, p. 287–371, 1993.
- THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 111–117, jun. 2005.
- THORNALLEY, P. J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **The Biochemical Journal**, v. 344 Pt 1, n. Pt 1, p. 109–116, 15 nov. 1999.
- TOTH, B. Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. **Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 4, n. 3 Pt 1, p. 494–496, jun. 1984.
- TOTH, C.; MARTINEZ, J.; ZOCHODNE, D. W. RAGE, diabetes, and the nervous system. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 766–776, dez. 2007.
- TROTTI, D. et al. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. **The European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 1236–1243, jun. 1997.
- UNITED NATIONS DEPARTMENT FOR ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. **World Population Prospects 2022: summary of results**. S.l.: United Nations, 2023.
- URIBARRI, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911–916.e12, jun. 2010.
- URIBARRI, J. et al. Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 461–473, jul. 2015.
- VANDER JAGT, D. L.; HUNSAKER, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143–144, p. 341–351, 1 fev. 2003.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of Astroglia. **Physiol Rev**, v. 98, p. 151, 2018.

VERONESE, N. et al. Weight loss is associated with improvements in cognitive function among overweight and obese people: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 72, p. 87–94, jan. 2017.

VICENTE, E. et al. S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, n. 11, p. 1126–1130, nov. 2007.

VICENTE MIRANDA, H.; EL-AGNAF, O. M. A.; OUTEIRO, T. F. Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Glycation in PD and AD. **Movement Disorders**, v. 31, n. 6, p. 782–790, jun. 2016.

VIZUETE, A. F. K. et al. Arundic acid (ONO-2526) inhibits stimulated-S100B secretion in inflammatory conditions. **Neuroscience Letters**, v. 751, p. 135776, abr. 2021.

VIZUETE, A. F. K. et al. Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 255, 11 out. 2022.

VLISSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 1, p. 453, jan. 2014.

VOLTERRA, A. et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 2924–2932, 1 maio 1994.

WALCZAK-NOWICKA, Ł. J.; HERBET, M. Sodium Benzoate—Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1497, 2 abr. 2022.

WANG, F. et al. Cinnamaldehyde Prevents Endothelial Dysfunction Induced by High Glucose by Activating Nrf2. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 315–324, 2015.

WEBER, B.; BARROS, L. F. The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a020396, 13 fev. 2015.

WEST, R. K. et al. Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 140, p. 10–12, set. 2014.

WETZELS, S. et al. Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation Endproducts Accumulate in Multiple Sclerosis Lesions. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 855, 2019.

WHITMER, R. A. et al. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7504, p. 1360, 11 jun. 2005.

XU, W. L. et al. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. **Neurology**, v. 76, n. 18, p. 1568–1574, 3 maio 2011.

YAGHMOOR, S. S.; KHOJA, S. M. Effect of Cinnamon on Plasma Glucose Concentration and the Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase Activity from the Liver and Small Intestine of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 8, p. 761–766, 26 fev. 2011.

YAMASHITA, H. et al. Use of skin advanced glycation end product levels measured using a simple noninvasive method as a biological marker for the diagnosis of neuropsychiatric diseases. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 29, n. 2, p. e1824, jun. 2020.

ZAGAMI, C. J. et al. Regulation of glutamate transporters in astrocytes: Evidence for a relationship between transporter expression and astrocytic phenotype. **Neurotoxicity Research**, v. 7, n. 1–2, p. 143–149, jan. 2005.

ZAKARIA, R. et al. Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Rats: a Model of Alzheimer's Disease. **Physiological Research**, p. 553–565, 31 ago. 2017.

ZHANG, S. et al. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases. **Progress in Neurobiology**, v. 204, p. 102089, set. 2021.

ZHANG, W. et al. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–32, 12 jul. 2023.

ZHAO, H. et al. Pharmacokinetic study of cinnamaldehyde in rats by GC-MS after oral and intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 150–157, fev. 2014.

ZHOU, B.; ZUO, Y.-X.; JIANG, R.-T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 665–673, jun. 2019.

ZHU, C. et al. Impact of Cinnamon Supplementation on cardiometabolic Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 53, p. 102517, set. 2020.

ZHU, G. et al. Crosstalk Between the Oxidative Stress and Glia Cells After Stroke: From Mechanism to Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 852416, 25 fev. 2022.

ZHU, R. et al. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. **Pharmacological Research**, v. 122, p. 78–89, ago. 2017.

ZUO, J. et al. Cinnamaldehyde Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice by Inducing Browning of White Adipose Tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 1514–1525, 2017.

## ANEXOS

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA NÚMERO 27570



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

**Comissão De Ética No Uso De Animais**



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 27570

**Título:** EFEITO DA EXPOSIÇÃO A ÁCIDOS GRAXOS (ÁCIDO ESTEÁRICO, ÁCIDO LÁURICO E ÁCIDO PALMÍTICO) EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATOS WISTAR

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 13/06/2014

DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA - pesquisador desde 13/06/2014

FERNANDA CAROLINA TELLES DA SILVA FRÓES - Aluno de Mestrado desde 13/06/2014

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/08/2014 - Sala 330 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 104 filhotes de ratos Wistar (machos ou fêmeas) de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Terça-Feira, 12 de Agosto de 2014

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética

## ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA NÚMERO CEUA 32774



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 32774

**Título:** Efeitos do cinamaldeído, um composto proveniente da canela, e de seu metabólito, NaB, em parâmetros astrocíticos em condições normais e de toxicidade induzida por modelos de inflamação e glicação em c

**Vigência:** 10/04/2017 à 09/04/2021

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MARINA CONCLI LEITE - coordenador desde 10/04/2017  
CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - pesquisador desde 10/04/2017  
FERNANDA CAROLINA TELLES DA SILVA FRÕES - Aluno de Doutorado desde 10/04/2017

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 08/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA, 110 BAIRRO FARROUPILHA -, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 440 ratos Wistar de 1 a 4 dias de idade, machos ou fêmeas, provenientes de biotério do Depto. de Bioquímica, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 19 de Maio de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

## ANEXO C – LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ciclo glutamato-glutamina e metabolismo de GSH
- Figura 2 Estrutura do lipopolissacarídeo
- Figura 3 Metabolização do cinamaldeído e do NaB
- Figura 4 Delineamento do modelo experimental 1
- Figura 5 Delineamento dos modelos experimentais 2 e 4
- Figura 6 Delineamento do modelo experimental 3
- Figura 7 Efeitos de cinamaldeído ou de NaB sobre a viabilidade celular em astrócitos
- Figura 8 Efeitos de cinamaldeído sobre o metabolismo de glutamato e a captação de glicose em astrócitos
- Figura 9 Efeitos de NaB sobre o metabolismo de glutamato e a captação de glicose em astrócitos
- Figura 10 Efeitos de cinamaldeído sobre a secreção e o conteúdo de S100B e o conteúdo de GFAP em astrócitos
- Figura 11 Efeitos de NaB sobre a secreção e o conteúdo de S100B e o conteúdo de GFAP em astrócitos
- Figura 12 Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por LPS sobre a secreção de TNF- $\alpha$  em astrócitos
- Figura 13 Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular em astrócitos
- Figura 14 Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por peróxido de hidrogênio sobre o metabolismo de glutamato em astrócitos
- Figura 15 Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por metilglioxal sobre a captação de glicose e a secreção e o conteúdo de S100B em astrócitos

## ANEXO D – LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teste t entre basal e veículo (DMSO 0,1%)
Tabela 2	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por LPS sobre a viabilidade celular em astrócitos
Tabela 3	Efeitos da pré-exposição com cinamaldeído ou com NaB frente a insulto induzido por metilglioxal sobre a viabilidade celular em astrócitos
Tabela 4	Principais resultados do capítulo II
Tabela 5	Principais resultados do modelo experimental 1 do capítulo III
Tabela 6	Principais resultados dos modelos experimentais 2, 3 e 4 do capítulo III