



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DILAILSON CARLOS COSTA JÚNIOR

**EFEITOS DA COLCHICINA SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO,
NEUROINFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM LINHAGENS CELULARES DE ASTRÓCITOS
E PC12: IMPLICAÇÕES PARA MODULAÇÃO DA VIA NRF-2**

FORTALEZA

2025

DILAILSON CARLOS COSTA JÚNIOR

EFEITOS DA COLCHICINA SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO, NEUROINFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM LINHAGENS CELULARES DE ASTRÓCITOS E PC12: IMPLICAÇÕES PARA MODULAÇÃO DA VIA NRF-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa
Florenço de Sousa

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- C871e Costa Júnior, Dilailson Carlos.
Efeitos da colchicina sobre estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) em linhagens celulares de astrócitos e PC12: implicações para a modulação da via Nrf2 / Dilailson Carlos Costa Júnior. – 2025.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Colchicina. 2. Fator 2 Relacionado a NF-E2. 3. Estresse Oxidativo. 4. Astrócitos. 5. Células PC12. I. Título.
-

CDD 615.1

DILAILSON CARLOS COSTA JÚNIOR

EFEITOS DA COLCHICINA SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO, NEUROINFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM LINHAGENS CELULARES DE ASTRÓCITOS E PC12: IMPLICAÇÕES PARA MODULAÇÃO DA VIA NRF-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 19/08/2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Claudia dos Santos Luciano
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos laboratórios de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX), de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), ao LAPSIT, LabNeuro e ao NPDM. Este agradecimento se estende a todos os seus integrantes — professores e alunos — que ofereceram estrutura e apoio imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Sou grato aos membros das bancas de qualificação e defesa pelas valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Agradeço à Professora Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa por ter aceitado ser minha orientadora durante o desenvolvimento deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos aos demais alunos do grupo de pesquisa da Professora Cléa pelo suporte constante, em especial à Sheila Mara, cuja contribuição foi essencial para a execução do projeto. Sou grato desde já.

Ao LAPSIT e às pessoas que lá conheci, deixo meu especial agradecimento. Destaco Maria Francilene (Fran) e Fátima de Cássia (Cássia), cujo suporte foi além das demandas do projeto, estendendo-se aos desafios enfrentados durante o mestrado. Espero que nosso companheirismo permaneça por muito tempo.

Também sou profundamente grato ao meu pai, pelo apoio prestado durante toda a jornada do mestrado.

Por fim, reconheço que não é possível fazer ciência sozinho. Se cheguei até aqui, foi graças à colaboração, apoio e generosidade de muitas pessoas. Sinto muito se, porventura, deixei de mencionar alguém pelo nome.

Atenciosamente,

Dilailson Carlos.

O presente trabalho foi realizado com apoio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 402512/2023-5).

RESUMO

Doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos compartilham processos patológicos comuns, como estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e morte celular. O fator de transcrição Nrf2 regula vias antioxidantes e citoprotetoras, sendo um alvo terapêutico promissor. A colchicina, tradicionalmente usada em doenças inflamatórias, tem demonstrado potencial para ativar o Nrf2, mas seus efeitos sobre células do sistema nervoso ainda são pouco conhecidos. Objetivou-se investigar os efeitos da colchicina, em baixas concentrações, sobre parâmetros de estresse oxidativo, inflamação, função mitocondrial e morte celular em astrócitos e células PC12 (Feocromocitoma) estimuladas com LPS (Lipopolissacarídeo). Avaliou-se viabilidade celular (MTT) com colchicina em astrócitos e PC12. Tais células foram expostas ao lipopolissacarídeo (LPS) (50 µg/mL) para indução de estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de colchicina (Col) (Col₁:0,312; Col₂:0,156 e Col₃:0,07815 µM) para avaliação de ROS intracelular (DCFH-DA), (NO₂⁻) (*Griess*), potencial mitocondrial (*Rhodamine 123*), tumescência mitocondrial e liberação de citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-1β) por ELISA. A colchicina reduziu significativamente os eventos de estresse oxidativo citoplasmático em astrócitos (LPS+Col₂: 0,9482 ±0,05592; LPS+ Col₃:0,8801 ±0,01104) e PC12 (LPS: 1,654 ±0,01617; LPS+Col₁: 0,9367 ±0,006825; LPS+Col₂: 0,6795 ±0,01; LPS+ Col₃: 0,6541 ±0,01782); e TNF-α em meio condicionado de astrócitos (LPS: 3,408 ±0,3655; LPS+Col₂: 0,9707 ±0,2598). Houve também restauração significativa do potencial mitocondrial em células PC12 (LPS: 0,6706 ±0,02813; LPS+Col₁: 1,177 ±0,06531; LPS+Col₂: 0,9941 ±0,01699; LPS+Col₃: 1,394 ±0,03225) e diminuição da tumescência mitocondrial na mesma linhagem (LPS: 0,1397 ±0,0008337; LPS+Col₁: 0,005867; LPS+Col₂: 0,005571 ±0,0006603; LPS+Col₃: 0,002700 ±0,0004502). Os resultados indicaram que a colchicina apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e protetores mitocondriais nas linhagens de astrócitos e PC12, reforçando o seu papel neuroprotetor em condições associadas à neuroinflamação.

Palavras-chave: Colchicina. Fator 2 Relacionado a NF-E2. Estresse oxidativo. Astrócitos. Células PC12.

ABSTRACT

EFFECTS OF COLCHICINE ON OXIDATIVE STRESS, NEUROINFLAMMATION, AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) IN ASTROCYTE AND PC12 CELL LINES: IMPLICATIONS FOR NRF2 PATHWAY MODULATION

Neurodegenerative diseases and psychiatric disorders share common pathological processes such as oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and cell death. The transcription factor Nrf2 regulates antioxidant and cytoprotective pathways, representing a promising therapeutic target. Colchicine, traditionally used in inflammatory diseases, has shown potential to activate Nrf2, but its effects on nervous system cells are still poorly understood. This study aimed to investigate the effects of colchicine, at low concentrations, on oxidative stress, inflammation, mitochondrial function, and cell death parameters in astrocytes and PC12 (pheochromocytoma) cells stimulated with LPS (lipopolysaccharide). Cell viability (MTT) was assessed in astrocytes and PC12 cells treated with colchicine. These cells were exposed to lipopolysaccharide (LPS) (50 $\mu\text{g/mL}$) to induce apoptosis, oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction. They were then treated with colchicine (Col) (Col1: 0.312; Col2: 0.156 and Col3: 0.07815 μM) for evaluation intracellular ROS (DCFH-DA), (NO_2^-) (Griess), mitochondrial membrane potential (Rhodamine 123), mitochondrial swelling, and cytokine release (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) by ELISA. Colchicine significantly reduced cytosolic oxidative stress in astrocytes (LPS+ Col₂: 0.9482 ± 0.05592 ; LPS+Col₃: 0.8801 ± 0.01104) and PC12 cells (LPS: 1.654 ± 0.01617 ; LPS+Col₁: 0.9367 ± 0.006825 ; LPS+Col₂: 0.6795 ± 0.01 ; LPS+Col₃: 0.6541 ± 0.01782); and TNF- α in conditioned medium from astrocytes (LPS: 3.408 ± 0.3655 ; LPS+Col₂: 0.9707 ± 0.2598). There was also significant restoration of mitochondrial membrane potential in PC12 cells (LPS: 0.6706 ± 0.02813 ; LPS+Col₁: 1.177 ± 0.06531 ; LPS+Col₂: 0.9941 ± 0.01699 ; LPS+Col₃: 1.394 ± 0.03225) and decreased mitochondrial swelling in the same cell line (LPS: 0.1397 ± 0.0008337 ; LPS+Col₁: 0.005867 ; LPS+Col₂: 0.005571 ± 0.0006603 ; LPS+Col₃: 0.002700 ± 0.0004502). The results indicated that colchicine exhibits antioxidant, anti-inflammatory, and mitochondrial-protective effects in astrocyte and PC12 cell lines, reinforcing its neuroprotective role in conditions associated with neuroinflammation.

Keywords: Colchicine. NF-E2-related factor 2. Oxidative stress. Astrocytes. PC12 cells. Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Domínios funcionais do fator de transcrição Nrf2 e suas principais interações regulatórias.....	14
Figura 2 – Mecanismos de regulação do Nrf2.	15
Figura 3 – Esquema simplificado da atuação de enzimas antioxidantes cuja síntese foi estimulada pelo Nrf2.	18
Figura 4 – Esquema simplificado elucidando mecanismos pelos quais Nrf2 regula processos pró-inflamatórios.	21
Figura 5 – Esquema simplificado elucidando mecanismos pelos quais o Nrf2 regula processos mitocondriais.	24
Figura 7 - <i>Colchicum autumnale</i> L. (Açafrão-do-outono).	29
Figura 8 - <i>Gloriosa superba</i> (Lírio-de-chama).	30
Figura 9 – Mecanismo de ação da colchicina — ativação indireta de Nrf2 devido à desestabilização de microtúbulos.	32
Figura 10 - Esquema simplificado do ensaio do MTT para determinar concentrações não tóxicas de colchicina que foram empregadas em ensaios posteriores.	39
Figura 11 - Fluxograma do processo de Plaqueamento, exposição à LPS e tratamento com colchicina.	41
Figura 12 - Fluxograma acerca da execução do ensaio de avaliação dos níveis de nitrito em meio condicionado de astrócitos e células PC12.	43
Figura 13 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação de Estresse Oxidativo citoplasmático em astrócitos e células PC12.	45
Figura 14 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação do potencial mitocondrial por meio da marcação com Rh123 em astrócitos e células PC12.	47
Figura 15 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação dos níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α	49
Figura 16 - Fluxograma do ensaio de avaliação da tumescência mitocondrial em mitocôndrias isoladas de astrócitos e células PC12.	52
Figura 17 - Perfil citotóxico da Colchicina para as linhagens celulares Astrócitos e PC12 determinado pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação na concentração inicial de 10 μ M, sem tratamento prévio com LPS.	53

Figura 18 - Níveis de Estresse Oxidativo citoplasmático em Astrócitos (A) e PC12 (B) após exposição à LPS e tratamento com colchicina.	57
Figura 19 - Comparação do grau de ativação (%) entre Astrócito e células PC12 no ensaio de Estresse Oxidativo por marcação com DCFH-DA.....	58
Figura 20 - Histograma representativo da análise do estresse oxidativo citossólico, realizado por citometria de fluxo utilizando o marcador DCFH-DA, em astrócitos (A) e células PC12 (B) após 24 horas de exposição ao LPS e tratamento com colchicina.	56
Figura 21 - Níveis de (NO_2^-) de Astrócitos após LPS somente e LPS+Colchicina em meio condicionado.	59
Figura 22 - Níveis de (NO_2^-) de células PC12 após LPS somente (A) e LPS+Colchicina (B) em meio condicionado.	61
Figura 23 - Avaliação do potencial transmembrana da mitocôndria em Astrócitos (A) e PC12 (B) após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.	63
Figura 24 - Comparação do grau de ativação (%) entre Astrócito e células PC12 no ensaio de potencial mitocondrial por marcação com <i>Rh123</i>	64
Figura 25 - Histogramas representativos da análise do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em astrócitos (A) e células PC12 (B), obtidos por citometria de fluxo utilizando o marcador Rodamina 123 (Rh123), após 24 horas de exposição ao LPS e posterior tratamento com colchicina.	61
Figura 26 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo dos astrócitos.	65
Figura 27 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo dos astrócitos.	67
Figura 28 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo de células PC12.	69
Figura 29 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo de células PC12.....	71
Figura 30 - Delta absorbância (ΔA) para astrócito (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.....	73
Figura 31 - Valores de absorbância ao longo do tempo (5 minutos) para astrócitos (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Tampão Isolamento, para pH 7,2.	50
Tabela 2 - Composição do Tampão Experimento, para pH 7,2.	50
Tabela 3 - Composição dos reagentes para a leitura das mitocôndrias	50
Tabela 4 - Valores de CI50 da Colchicina para as células Astrócito e PC12, obtidos a partir do MTT após 24h de incubação com colchicina, sem tratamento prévio com LPS.	54
Tabela 5 – Concentrações selecionadas de colchicina para Astrócito e PC12, com seus respectivos valores de viabilidade celular, obtidos com ensaio do MTT após 24h de incubação, sem tratamento prévio com LPS.	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. Estresse Oxidativo	16
1.2. Inflamação.....	18
1.3. Processos Mitocondriais	21
1.4. Astrócitos	24
1.5. Células PC12 (Feocromocitoma murino).....	26
1.6. Lipopolissacarídeo – LPS	27
1.7. Colchicina.....	29
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 Ensaios <i>in vitro</i>	37
4.1.1 Linhagens celulares	37
4.1.2 Manutenção das linhagens celulares	37
4.1.3 Avaliação da viabilidade celular.....	38
4.1.3.1 <i>Princípio do teste de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium)</i>	38
4.1.4 Plaqueamento, exposição à LPS e tratamento com Colchicina	40
4.1.5 Avaliação da produção de Nitrito/Nitrato (NO_2^-) em meio condicionado	41
4.1.6 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) citoplasmáticas	43
4.1.7 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	45
4.1.8 Avaliação dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e $\text{IL-1}\beta$ em células e em meio condicionado	47
4.1.9 Avaliação da tumescência mitocondrial (<i>Swelling Mitocondrial</i>)	49
4.1.10 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Avaliação da viabilidade celular	53
5.2 Avaliação do Estresse Oxidativo por marcação citoplasmático com DCFH-DA	55
5.3 Produção dos níveis de Nitrito/Nitrato (NO_2^-) em meio condicionado	58

5.3.1	<i>Astrócitos</i>	58
5.3.2	<i>PC12 (Feocromocitoma)</i>	60
5.4	Avaliação do potencial mitocondrial por meio da marcação com Rh123	61
5.5	Avaliação dos níveis de citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α	64
5.5.1	<i>Astrócito - Meio condicionado</i>	64
5.5.2	<i>Astrócito – Homogenato celular</i>	66
5.5.3	<i>PC12 – Meio condicionado</i>	68
5.5.4	<i>PC12 – Homogenato celular</i>	70
5.6	Avaliação da tumescência mitocondrial (<i>Swelling</i> mitocondrial)	72
6	DISCUSSÃO	75
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

Transtornos neurodegenerativos e neuropsiquiátricos, como Alzheimer, Parkinson, depressão e esquizofrenia, estão frequentemente associados a processos de neuroinflamação e estresse oxidativo exacerbado (Trofin et al., 2025). A ausência de terapias capazes de modificar o curso dessas doenças evidencia a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, o fator nuclear relacionado ao fator eritroide 2 (Nrf2) tem se destacado como alvo promissor por modular vias antioxidantes, anti-inflamatórias e mitocondriais (Brandes e Gray 2020). Entretanto, o desafio atual reside na identificação de compostos capazes de ativar seletivamente essa via no sistema nervoso central, com eficácia e segurança.

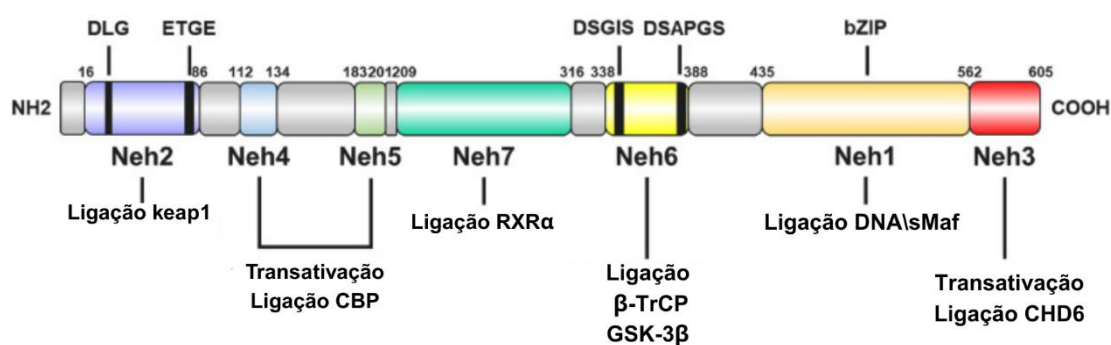
O fator Nrf2 pertence à família dos fatores de transcrição Cap'n'collar (CNC) e é codificado pelo gene *NFE2L2*. Composto por 605 aminoácidos, o Nrf2 apresenta sete domínios funcionais altamente conservados, denominados Neh1 a Neh7 (Saha et al., 2020), cada um associado a funções específicas na regulação da atividade transcricional (Zuo et al., 2022). O domínio Neh1 contém uma alça básica com zíper de leucina (bZIP), estrutura na qual resíduos de leucina ocorrem em intervalos regulares. Esse domínio exibe carga positiva, atribuída à presença de aminoácidos como lisina, arginina e histidina, característica essencial para a ligação ao DNA e à interação com proteínas, como as sMaf (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma*) (Zuo et al., 2022) (Figura 1).

O Neh2 abriga dois *motifs* específicos de aminoácidos, ETGE (ácido glutâmico-treonina-glicina-ácido glutâmico) e DLG (ácido aspártico-leucina-glicina), que mediam a interação com a proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Essa interação é crucial para a ubiquitinação dependente de Keap1 e a posterior degradação proteossomal do Nrf2. (Mohan; Gupta, 2018). O domínio Neh3 atua como modulador da ativação gênica mediada por ARE, interagindo com o coativador transcricional CHD6 (Zhang; Feng; Jiang, 2021). Já os domínios Neh4 e Neh5 participam da ativação transcricional do Nrf2 ao se ligarem à CBP (CREB-binding protein), facilitando a transcrição de genes-alvo (Sivandzade et al., 2019) et al., 2019).

O Neh6 está envolvido na degradação do Nrf2 de forma independente de Keap1, por meio de seus *motifs* DSGIS e DSAPGS, que interagem com a proteína β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein). Além disso, esse domínio pode ser fosforilado pelo glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), influenciando a estabilidade da proteína. O Neh7, por sua vez,

atua inibindo a via de sinalização Nrf2–ARE, através da ligação ao receptor X de retinoide α (RXR α) (Chowdhry et al., 2012; Osama et al., 2020).

Figura 1 - Domínios funcionais do fator de transcrição Nrf2 e suas principais interações regulatórias.



Representação esquemática dos domínios funcionais do fator de transcrição Nrf2 e seus principais *motifs* estruturais. O Neh1 está associado à ligação ao DNA e interação com proteínas sMaf; o Neh2 contém os *motifs* ETGE e DLG, essenciais para a interação com Keap1 e regulação da degradação proteossomal de Nrf2; os domínios Neh3, Neh4 e Neh5 estão envolvidos na ativação da transcrição via interação com coativadores como CHD6 e CBP; o Neh6 atua na degradação independente de Keap1 por meio da ligação com β -TrCP; e o Neh7 é responsável por suprimir a via Nrf2–ARE ao interagir com o RXR α . Fonte: Adaptado de (Zuo et al., 2022).

A via Nrf2–ARE é regulada principalmente pela Keap1, considerada seu principal inibidor negativo (Saha et al., 2022). A Keap1 contém domínios *Bric-a-Brac* (BTB) que permitem a formação de homodímeros, os quais se ligam aos *motifs* ETGE e DLG do Nrf2 (Zhang; Feng; Jiang, 2021). Nessas condições basais, o complexo Keap1–Nrf2 interage com o complexo E3 ubiquitina ligase Cullin 3 (Cul3), promovendo a ubiquitinação do Nrf2 e sua subsequente degradação pelo proteassomo 26S (Figura 2)(Sivandzade et al., 2019).

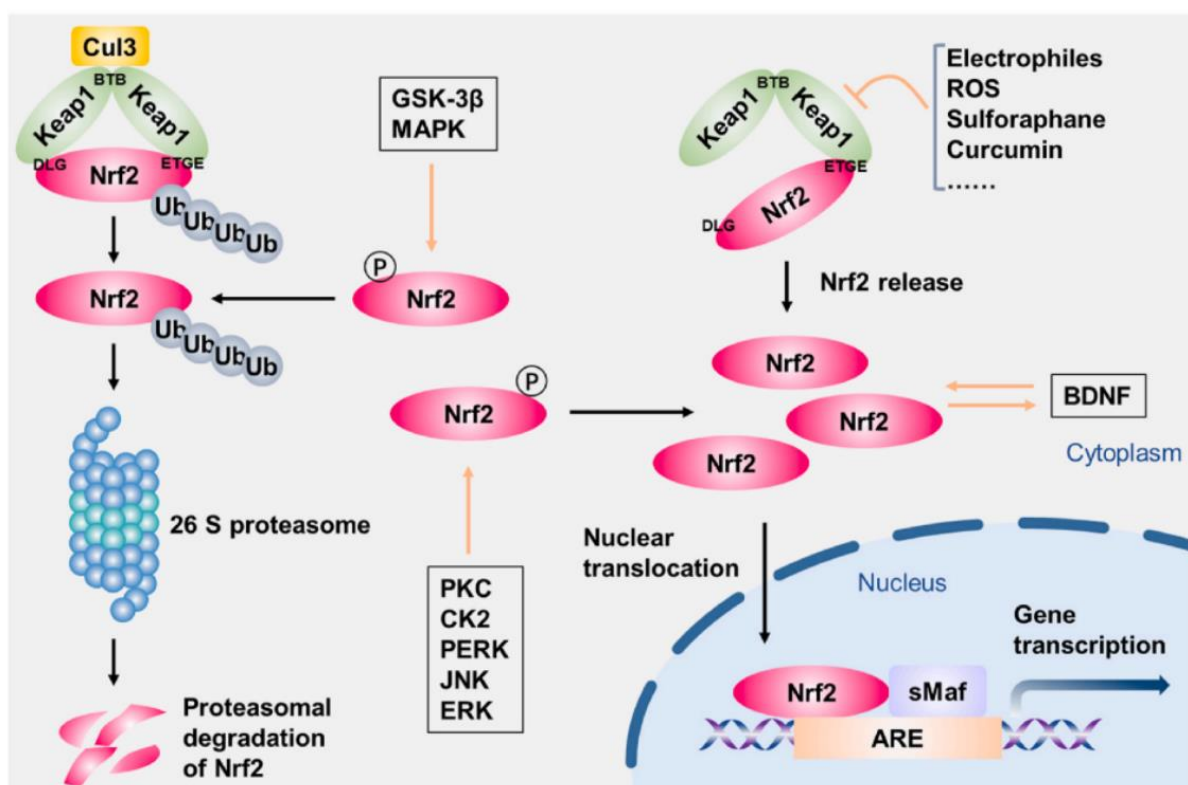
Sob estímulos de estresse, como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou a presença de compostos como curcumina e colchicina, ocorrem alterações conformacionais na Keap1, especialmente no domínio DLG. Isso enfraquece a interação com o *motif* DLG, impedindo a ubiquitinação e permitindo que o Nrf2 seja liberado e transloque-se para o núcleo (Zuo et al., 2022).

No núcleo, o Nrf2 forma um complexo heterodimérico com sMaf, que se liga aos elementos de resposta antioxidante (AREs) — sequências localizadas nas regiões promotoras de genes antioxidantes. Essa ligação estimula a síntese de enzimas antioxidantes, como heme oxigenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxirredutase 1 (NQO1) e glutatona S-

transferases (GSTs), que desempenham papéis centrais na defesa celular contra o estresse oxidativo (Chen et al., 2024; Hirotsu et al., 2012; Seol et al., 2024; Simon-Molas et al., 2022; Wu; Zhang; Du, 2016).

Além da via clássica, há mecanismos alternativos de ativação do Nrf2 independentes de Keap1, envolvendo diversas quinases. Entre elas, destacam-se: proteína quinase C (PKC), caseína quinase II (CK2), PERK, JNK e ERK, que podem fosforilar o Nrf2 e promover sua translocação nuclear (Cullinan; Diehl, 2004; Huang; Nguyen; Pickett, 2002; Keum et al., 2006; Pi et al., 2007). Por outro lado, a fosforilação por GSK-3 β e por p38 MAPK favorece a degradação do Nrf2 (Chowdhry et al., 2012; Yoon; Youn; Jun, 2021). Outros reguladores negativos da atividade de Nrf2 incluem BACH1 e Hrd1, enquanto o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) atua positivamente, estimulando sua translocação nuclear (Figura 2) (Yu et al., 2021).

Figura 2 – Mecanismos de regulação do Nrf2.



Fonte: Adaptado de Zuo et al., 2022.

Além da via clássica mediada por Keap1, o Nrf2 também pode ser ativado por vias alternativas independentes, envolvendo quinases como a proteína quinase C (PKC), a caseína quinase II (CK2), a PERK, a JNK e as ERK, que promovem sua fosforilação e translocação

para o núcleo (Cullinan; Diehl, 2004; Huang; Nguyen; Pickett, 2002; Keum et al., 2006; Pi et al., 2007). Em contraste, outras fosforilações, como aquelas mediadas por GSK-3 β e pelas MAPKs p38, favorecem sua degradação (Chowdhry et al., 2012; Yoon; Youn; Jun, 2021). Além disso, proteínas como BACH1 e Hrd1 atuam negativamente sobre o Nrf2, enquanto o BDNF exerce ação positiva, favorecendo sua translocação nuclear (Yu et al., 2022).

Importante destacar que o Nrf2 também regula processos autofágicos, controlando a expressão de genes como p62, NDP52 e ULK1 (Pajares et al., 2016; Kang et al., 2014). Embora esse mecanismo não tenha sido abordado experimentalmente neste estudo, sua integração com as vias redox e mitocondriais reforça o papel multifuncional do Nrf2 na manutenção da homeostase celular (Jin et al., 2019).

1.1 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição oriunda do desequilíbrio entre produção de Espécies reativas de Oxigênio (ROS) e a capacidade do organismo em neutralizá-las e reparar o dano resultante. Neste caso, há um predomínio da produção de ROS e uma diminuição da capacidade do organismo em neutralizá-las, o que acarreta disfunções moleculares. No Sistema Nervoso central, neurônios são susceptíveis ao estresse oxidativo devido a sua alta taxa metabólica e consumo de oxigênio (Moustapha, 2020). Conforme mencionado, o estresse oxidativo pode ativar o fator de transcrição Nrf2 por meio de alterações conformacionais na proteína Keap1, permitindo sua translocação para o núcleo, onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (AREs) e induz a transcrição de genes codificadores de enzimas antioxidantes (Figura 3) (Yamamoto; Kensler; Motohashi, 2018; Zuo et al., 2022). Dentre os genes-alvo mais estudados está a *heme oxygenase-1* (HO-1), cuja expressão é significativamente aumentada pela ativação do Nrf2 (Jian et al., 2011; Liu et al., 2017). A HO-1 catalisa a degradação do grupo heme em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro livre — compostos que contribuem para a proteção celular em condições de estresse oxidativo (Chen et al., 2020).

A biliverdina e sua forma reduzida, a bilirrubina, apresentam propriedades antioxidantes que auxiliam na redução do dano celular, especialmente no tecido cerebral (Piras et al., 2017). O CO, em quantidades não tóxicas, por sua vez, modula a vasodilatação e a resposta inflamatória, aspectos relevantes no sistema nervoso central, onde processos inflamatórios exacerbados podem gerar lesão neuronal (Chen et al., 2020). Além disso, a atividade da HO-1

pode favorecer o fluxo sanguíneo e a oferta de nutrientes ao tecido cerebral comprometido, por meio da indução de vasodilatação e da redução de marcadores inflamatórios (Pastorino et al., 1999). Outro papel importante da HO-1 é a regulação da apoptose sob estresse oxidativo, sendo que sua expressão demonstrou proteger contra a apoptose neuronal (Wang et al., 2019).

A enzima superóxido dismutase (SOD), cuja expressão é induzida pela ativação do Nrf2, desempenha papel fundamental no sistema nervoso central ao combater o estresse oxidativo, catalisando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado pelo metabolismo celular, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (Figura 3) (Azenabor et al., 2018). Os radicais superóxidos são altamente reativos e podem provocar danos celulares por meio da peroxidação lipídica, modificações proteicas e lesões ao DNA — processos associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Ilyas et al., 2020). A SOD apresenta diferentes isoformas, entre as quais se destacam a SOD1, localizada no citoplasma, e a SOD2, presente nas mitocôndrias. A SOD1 contribui para neutralizar espécies reativas geradas pela intensa atividade metabólica neuronal, enquanto a SOD2 atua principalmente sobre o estresse oxidativo mitocondrial, uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio nos neurônios (Li et al., 2022). Evidências indicam que a redução da expressão de SOD, especialmente da SOD2, está associada ao aumento de marcadores de estresse oxidativo e dano neuronal em contextos de inflamação e hipóxia (Horspool; Chang, 2018).

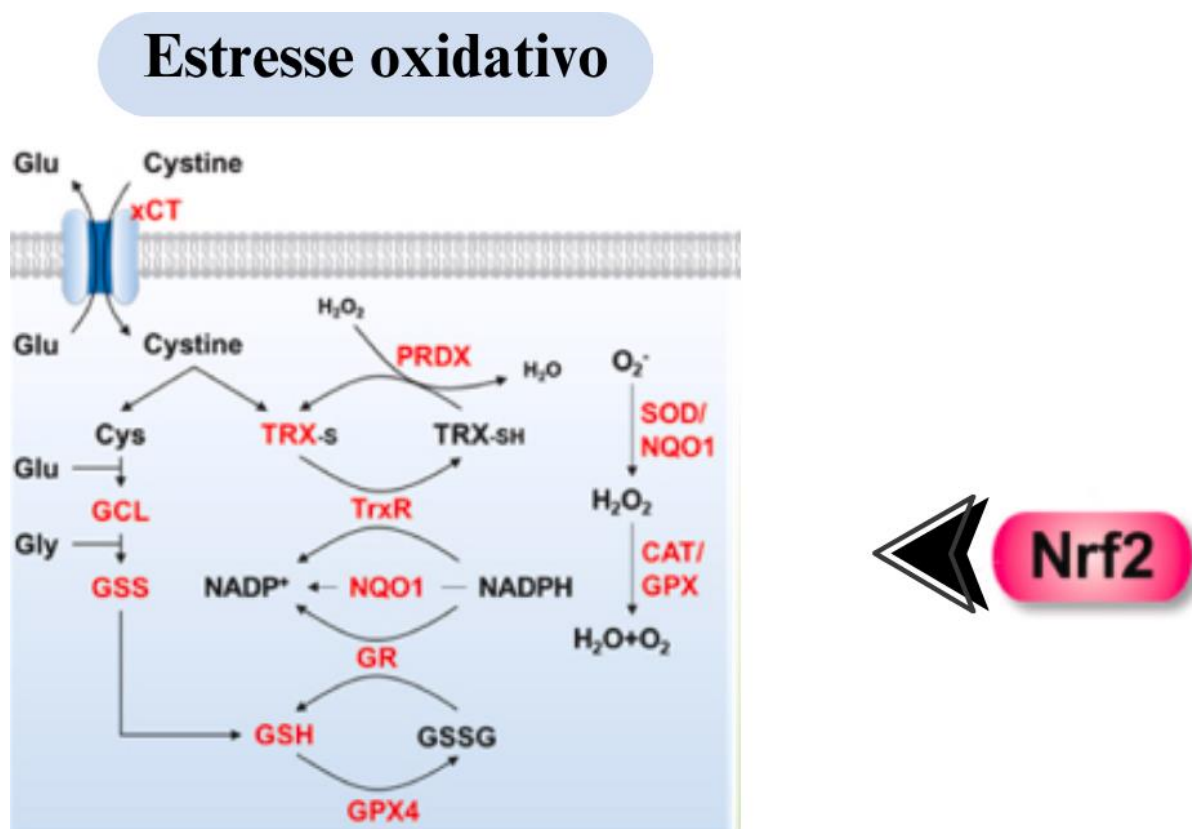
A enzima glutathiona peroxidase (GPx), cuja expressão também é estimulada pela atividade do fator de transcrição Nrf2, exerce um papel relevante no contexto do estresse oxidativo, especialmente no sistema nervoso central (SNC) (Shirakawa et al., 2015; Shukla et al., 2017; Yang et al., 2015). Sua principal função é catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de peróxidos orgânicos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como substrato, resultando na formação de água (H_2O) e glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 3) (Kadhim; Noori, 2023; Rauscher; Sanders; Watkins, 2025).

A GPx atua de forma integrada com outros sistemas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, na neutralização de espécies reativas de oxigênio (Rauscher; Sanders; Watkins, 2025; Wahl; Koopmann; Ammon, 2009). Conforme mencionado, a SOD converte o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio, e a GPx, por sua vez, detoxifica o H_2O_2 formado, convertendo-o em água. Esse mecanismo cooperativo é fundamental para a proteção celular frente ao estresse oxidativo (Figura 3) (Kadhim; Noori, 2023; Rauscher; Sanders; Watkins, 2025).

Níveis elevados de peróxido de hidrogênio no SNC podem causar danos neuronais por meio da ativação de vias pró-apoptóticas, culminando em morte celular. Dessa forma, a

atividade da GPx na degradação do H_2O_2 contribui significativamente para a neuroproteção (Tennakoon et al., 2013). De fato, evidências indicam que a redução da atividade da GPx está frequentemente associada ao aumento de marcadores de estresse oxidativo em diversas doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Kadhim; Noori, 2023).

Figura 3 – Esquema simplificado da atuação de enzimas antioxidantes cuja síntese foi estimulada pelo Nrf2.



Fonte: Adaptado de Zuo et al., 2022 por meio do Biorender e Canvas.

1.2 Inflamação

O fator de transcrição Nrf2 exerce um importante efeito anti-inflamatório, principalmente por meio da inibição da via do NF- κ B (Figura 4), a qual, quando ativada, estimula a transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Sun et al., 2016). Estudo envolvendo a indução de inflamação com lipopolissacarídeo (LPS) demonstrou que a ativação da via Nrf2 provocou redução dos níveis de NF- κ B, atenuando, assim, a resposta

inflamatória (Wruck *et al.*, 2011). Uma das hipóteses para esse efeito é a competição entre Nrf2 e NF- κ B por coativadores comuns, como a proteína de ligação à CREB (CBP), no núcleo celular. Ambos os fatores requerem CBP e a subunidade p65 para exercerem suas atividades transcricionais. No entanto, com o aumento da atividade de Nrf2, a disponibilidade de CBP para NF- κ B é reduzida, o que compromete a sua capacidade transcricional e diminui, consequentemente, a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (Figura 4) (He *et al.*, 2025; Mureşan *et al.*, 2021).

Outra forma de inibição do NF- κ B promovida por Nrf2 ocorre por meio da degradação autofágica das quinases IKK, cuja função é fosforilar as proteínas I κ B (inibidores de NF- κ B). Quando essas proteínas são fosforiladas, NF- κ B se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes inflamatórios. Assim, a diminuição da disponibilidade de IKK (Figura 4), promovida pela ativação de mecanismos autofágicos induzidos por Nrf2, reduz a quantidade de NF- κ B funcional no núcleo (Kanamoto *et al.*, 2018).

Adicionalmente, o Nrf2 inibe diretamente a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias por meio da interferência no recrutamento da RNA polimerase II aos promotores gênicos, suprimindo a expressão de mediadores como IL-6, IL-1 β e TNF- α (Muri *et al.*, 2020). Com isso, consegue reduzir a resposta inflamatória em diferentes contextos, incluindo reações alérgicas e sepse (Nagashima *et al.*, 2019). Em modelos animais de alergia, por exemplo, a ativação de Nrf2 levou à diminuição da liberação de IL-33, um potente mediador pró-inflamatório, o que se associou à atenuação da inflamação brônquica (Du *et al.*, 2021).

Pesquisas também indicam que a ativação de Nrf2 reduz a polarização de macrófagos para o fenótipo pró-inflamatório (M1), o qual está relacionado à produção de citocinas como TNF- α e IL-6. Paralelamente, promove a polarização para o fenótipo anti-inflamatório (M2), associado a funções de resolução inflamatória e reparo tecidual (Eduardo E Egea; Nnamdi Azih, 2015; Luo *et al.*, 2022). Esse efeito é especialmente relevante em casos de inflamação crônica, nos quais a polarização M2 contribui para a reparação dos tecidos e redução da inflamação (Yang *et al.*, 2020). De forma inversa, a redução da atividade de Nrf2 favorece a polarização para o perfil M1.

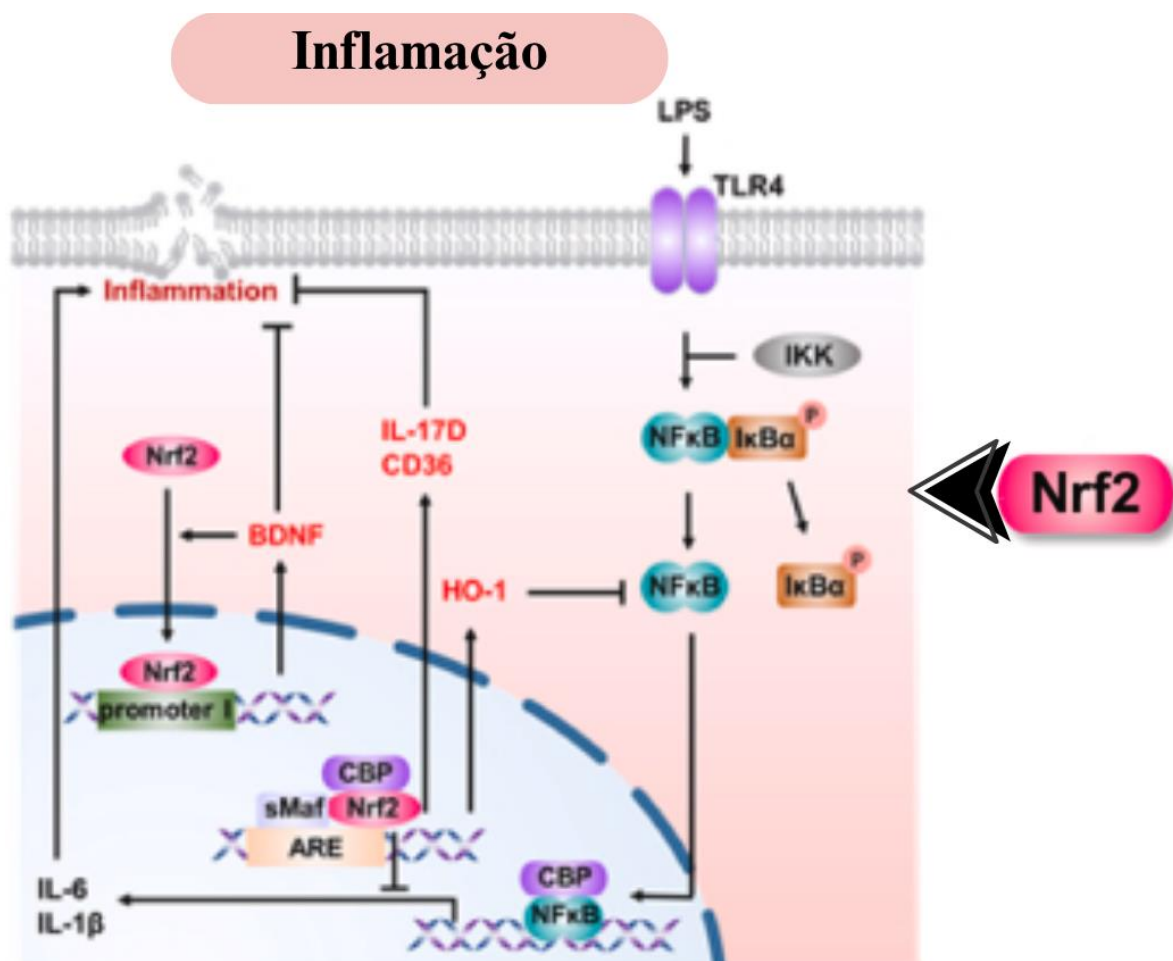
Outro importante mecanismo anti-inflamatório mediado por Nrf2 está relacionado ao controle do estresse oxidativo. Após sua ativação e translocação ao núcleo, Nrf2 se liga a elementos de resposta antioxidante (AREs), promovendo a expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes, como heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e glutatona S-transferases (GSTs) (Figuras 3 e 4) (Du *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020). A regulação do estresse oxidativo contribui para a supressão da resposta inflamatória, uma vez

que espécies reativas de oxigênio (ROS) frequentemente precedem e amplificam os processos inflamatórios. Além disso, a redução do estresse oxidativo também inibe outras vias inflamatórias, como a via de NF- κ B e a via das MAPKs (Muri et al., 2020; Wang et al., 2018).

No contexto de transtornos neurodegenerativos, evidências apontam que a atividade reduzida de Nrf2 na Doença de Alzheimer está associada ao aumento da toxicidade das placas de β -amiloide e a uma resposta antioxidante insuficiente, contribuindo, assim, para a geração de neuroinflamação (Davies; Adlimoghaddam; Albeni, 2021). Além disso, compostos capazes de restaurar a atividade de Nrf2 demonstraram aumentar a resistência dos neurônios ao estresse oxidativo e reduzir a neuroinflamação (Amoroso; Maccallini; Bellezza, 2023; Culbreth; Aschner, 2018). Substâncias ativadoras dessa via mostraram-se eficazes na redução de marcadores patológicos em modelos animais das Doenças de Alzheimer e de Huntington (Neymotin et al., 2011). Na Doença de Parkinson, a ativação de Nrf2 também se mostrou promissora na atenuação da neuroinflamação associada à neurodegeneração (Saha et al., 2022).

Em relação aos transtornos neuropsiquiátricos, níveis diminuídos de Nrf2 foram associados ao aumento da susceptibilidade ao transtorno depressivo maior e ao transtorno bipolar. Além disso, a desregulação dessa via correlaciona-se com maior neuroinflamação e redução da expressão do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), o que está relacionado à disfunção do humor e à plasticidade sináptica comprometida (Ghanbarirad et al., 2021).

Figura 4 – Esquema simplificado elucidando mecanismos pelos quais Nrf2 regula processos pró-inflamatórios.



Fonte: Adaptado de Zuo et al., 2022 por meio do Biorender e Canvas.

1.3 Processos Mitocondriais

O fator de transcrição Nrf2 também participa da regulação da função mitocondrial (Figura 5). Ele está envolvido em processos relacionados à resposta ao estresse oxidativo, à biogênese mitocondrial e à mitofagia — uma forma específica de autofagia voltada à degradação seletiva de mitocôndrias danificadas. O estresse oxidativo é predominantemente gerado durante a fosforilação oxidativa mitocondrial. Assim, como o Nrf2 ativado estimula a transcrição de diversas enzimas antioxidantes, sua ação resulta na diminuição dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS), protegendo, consequentemente, a integridade mitocondrial (Li et al., 2021; MacGarvey et al., 2012).

Em relação à biogênese mitocondrial, a ativação do Nrf2 aumenta a expressão do coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 α) (Jiao et al., 2019; Sun et al., 2021). O PGC-1 α é amplamente reconhecido como um regulador essencial da biogênese e função mitocondriais, atuando como coativador transcricional de fatores de transcrição, como os fatores respiratórios nucleares (NRF1 e NRF2). Essa interação leva à maior expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial, à fosforilação oxidativa e à oxidação de ácidos graxos (Figura 5) (Chang et al., 2018; Li et al., 2021).

O PGC-1 α contribui significativamente para a geração de novas mitocôndrias e para a melhoria da função mitocondrial ao promover a transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA) e de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais (Chang et al., 2018; Li et al., 2021).. Além disso, ele facilita a adaptação metabólica das células a estímulos externos, como exercício físico e restrição calórica, o que é essencial para a manutenção da saúde mitocondrial, especialmente em tecidos com elevada demanda energética, como o cérebro (Tennakoon et al., 2013).

Estudos indicam uma interação funcional entre Nrf2 e PGC-1 α na promoção da biogênese mitocondrial e na defesa antioxidante. A ativação de Nrf2 pode levar ao aumento da expressão de PGC-1 α e de seus genes-alvo, resultando em maior massa mitocondrial e melhor desempenho metabólico sob condições de estresse oxidativo (Lai et al., 2024; Li et al., 2021a). Isso evidencia que o Nrf2 influencia a integridade mitocondrial tanto por meio da regulação de genes antioxidantes quanto pela regulação positiva de PGC-1 α . Estudos de coimunoprecipitação demonstraram a interação física entre Nrf2 e PGC-1 α , destacando a cooperação entre esses dois fatores (Sun et al., 2021; Zhang et al., 2018). Em modelos de neurodegeneração e estresse oxidativo, foi observado que a ação conjunta de PGC-1 α e Nrf2 protege contra a morte celular, promovendo a integridade mitocondrial e reduzindo os níveis de ROS (Guo et al., 2020; Zhi et al., 2020). Além disso, o Nrf2 também pode influenciar diretamente a expressão de genes que codificam componentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e da ATP sintase (Holmström et al., 2013; Zhang et al., 2023).

O Nrf2 ainda desempenha um papel na regulação dos processos de fusão e fissão mitocondriais (Figura 5). A fusão mitocondrial, na qual duas mitocôndrias se unem formando uma rede maior, é mediada por proteínas como as mitofusinas (Mfn1 e Mfn2) e a OPA1 (proteína da atrofia óptica 1). Esse processo promove a mistura do conteúdo mitocondrial, como enzimas e DNA, o que favorece o metabolismo energético e aumenta a produção de ATP,

garantindo uma função mitocondrial eficiente mesmo sob estresse (Jiang et al., 2022; Kumar et al., 2016; Yu et al., 2021). A fusão também permite a troca de metabólitos entre mitocôndrias, contribuindo para a manutenção de sua funcionalidade (Dong et al., 2021; Kumar et al., 2016).

Por outro lado, a fissão mitocondrial, processo pelo qual uma mitocôndria se divide em duas ou mais, é essencial para a eliminação de mitocôndrias danificadas por meio da mitofagia. Esse processo é principalmente regulado pela proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1) e pela proteína de fissão da membrana externa mitocondrial (Fis1) (Byrne et al., 2019; Lan et al., 2022). A fissão permite o isolamento de regiões mitocondriais comprometidas e sua posterior degradação seletiva. Além disso, facilita o transporte de mitocôndrias para regiões celulares com alta demanda energética, otimizando a eficiência metabólica (Ma; Dong, 2019).

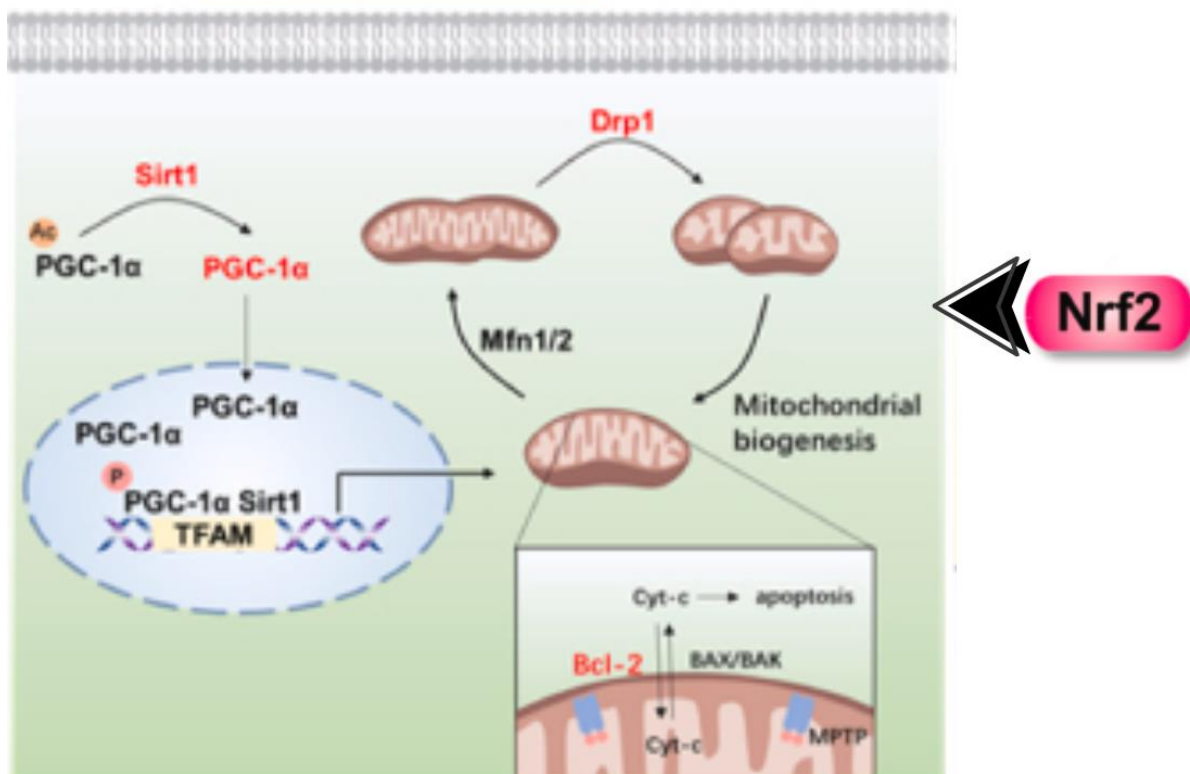
Nesse contexto, o Nrf2 modula a expressão e a atividade de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial (Figura 5). A sua ativação pode reduzir os níveis de Drp1, o que ajuda a evitar a fragmentação mitocondrial excessiva — condição frequentemente associada à disfunção mitocondrial e à apoptose aumentada (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2021). O Nrf2 também regula positivamente a expressão de Mfn1, Mfn2 e OPA1, proteínas essenciais para a fusão mitocondrial. Assim, a ativação do Nrf2 contribui para o equilíbrio entre os processos de fusão e fissão mitocondriais, especialmente sob condições estressoras (Liu et al., 2020; Yang et al., 2022), sendo esse equilíbrio fundamental para a adaptação da mitocôndria ao estresse celular (O’Mealey; Berry; Plafker, 2016).

De fato, a manutenção desse equilíbrio é crucial para o funcionamento adequado das mitocôndrias, visto que desequilíbrios nos processos de fusão e fissão estão associados a diversas patologias, como doenças neurodegenerativas, distúrbios metabólicos e cardiovasculares. Nessas condições, a fissão excessiva tem sido relacionada à fragmentação mitocondrial e consequente perda de função (Dong et al., 2021; Trevisan et al., 2018).

Para investigar potenciais efeitos neuroprotetores da colchicina, astrócitos e células PC12 representam modelos experimentais relevantes, pois mimetizam respostas inflamatórias e oxidativas do sistema nervoso central. A exposição ao LPS é amplamente empregada para induzir neuroinflamação *in vitro*, promovendo a liberação de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção mitocondrial, condições semelhantes às observadas em doenças do SNC.

Figura 5 – Esquema simplificado elucidando mecanismos pelos quais o Nrf2 regula processos mitocondriais.

Função mitocondrial



Fonte: Adaptado de Zuo et al., 2022 por meio do Biorender e Canvas.

1.4 Astrócitos

Os astrócitos são as principais células gliais do sistema nervoso central (SNC). Entre suas funções destacam-se o suporte estrutural aos neurônios, a regulação da homeostase, da neurotransmissão e a participação na resposta a lesões. A desregulação de suas funções está associada à fisiopatologia de diversas condições neurológicas e psiquiátricas, evidenciando sua importância. Além disso, essas células respondem a estímulos no SNC, como infecções, lesões ou processos neurodegenerativos, tornando-se reativas, um fenômeno conhecido como astrogliose. Nesse estado, os astrócitos podem induzir estresse oxidativo, modificar suas

propriedades funcionais e liberar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Neal; Richardson, 2018; Lee et al., 2013).

Os astrócitos também exercem papel essencial na defesa antioxidante cerebral. Eles fornecem suporte metabólico aos neurônios sob estresse oxidativo e regulam os níveis de glutathione (GSH), um dos principais antioxidantes endógenos (Bell et al., 2011; Narasimhan et al., 2012). Quando os neurônios são expostos ao estresse oxidativo decorrente da neuroinflamação, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode exceder a capacidade antioxidante de astrócitos e neurônios, levando à disfunção celular e apoptose.

Em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, alterações nas funções astrocíticas contribuem para a progressão da patologia por meio de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo. Níveis elevados de ROS ativam os astrócitos, que passam a liberar citocinas pró-inflamatórias, intensificando o dano neuronal (Martorana et al., 2019). Evidências sugerem que a disfunção dos astrócitos está associada à perda de conexões sinápticas e ao avanço da doença em modelos de Alzheimer (Kim; Kwon, 2013; Tang et al., 2023).

Os astrócitos também têm sido implicados em transtornos psiquiátricos, como depressão e esquizofrenia. Nestes casos, observam-se alterações no transporte e metabolismo do glutamato mediados por essas células. O estresse oxidativo elevado pode prejudicar a função astrocítica, comprometendo a regulação dos neurotransmissores e contribuindo para os distúrbios (Reyes et al., 2012). De fato, há evidências de que o estresse oxidativo desregula o transporte de glutamato, resultando em excitotoxicidade e agravamento dos sintomas neuropsiquiátricos.

Quando ativados, os astrócitos sofrem alterações morfológicas e aumentam a expressão de mediadores inflamatórios (Chabry et al., 2015; Li et al., 2017). A exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo, estimula a liberação de citocinas como IL-1 β e TNF- α , promovendo uma resposta neuroinflamatória (Li et al., 2017; Troubat et al., 2020). Esse ambiente pró-inflamatório pode prejudicar os neurônios, induzir disfunção sináptica e exacerbar a dor, contribuindo para o desenvolvimento de transtornos do humor, como ansiedade e depressão (Wang; Liu; Jing, 2022).

Estudos demonstram que a liberação de IL-1 β em resposta a fatores estressores está associada ao aumento de comportamentos semelhantes à depressão e à ansiedade em modelos animais (Chabry et al., 2015; Li et al., 2017). Além disso, intervenções que reduzem a reatividade astrocítica ou inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias têm potencial para atenuar a resposta neuroinflamatória nesses transtornos (Lü et al., 2022).

As mitocôndrias dos astrócitos não apenas produzem ATP, mas também participam da regulação do equilíbrio redox e das vias metabólicas essenciais para a função neuronal (Liang et al., 2024). A disfunção mitocondrial nessas células compromete o suporte metabólico, podendo intensificar a neurodegeneração. Evidências indicam que a depleção do DNA mitocondrial (mtDNA) em astrócitos leva à ativação crônica dessas células, favorecendo o surgimento precoce de processos neurodegenerativos (Ignatenko et al., 2018; Liang et al., 2024). Além disso, a disfunção mitocondrial astrocítica contribui para o aumento da neuroinflamação, funcionando como fonte de mediadores inflamatórios e intensificando a produção de ROS (Borbor et al., 2023; Voloboueva et al., 2007).

1.5 Células PC12 (Feocromocitoma murino)

As células PC12, derivadas do feocromocitoma de rato, foram estabelecidas em 1970 e, desde então, são amplamente estudadas como modelo em neurobiologia devido à sua responsividade ao Fator de Crescimento Neuronal (NGF), o que lhes confere características neuronais, como síntese de neurotransmissores e crescimento de neuritos. As PC12 possuem excitabilidade elétrica semelhante à dos neurônios, além de expressarem marcadores neuronais; portanto, por simularem o comportamento neuronal, podem ser empregadas para estudar neurotoxicidade, neuroinflamação e outras vias que influenciam a viabilidade neuronal (Schinzel et al., 2005).

No contexto das doenças neurodegenerativas, as células PC12 são utilizadas para investigar os efeitos de agentes neurotóxicos. Por exemplo, para mimetizar a patofisiologia da Doença de Parkinson, a exposição das PC12 à 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) provoca estresse oxidativo e morte celular subsequente (Zhong et al., 2015). De forma similar, após toxicidade induzida por A β , as células PC12 refletem processos envolvidos na doença de Alzheimer, incluindo estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Xie et al., 2023).

Além disso, as células PC12 são importantes para investigar transtornos psiquiátricos, dado o forte vínculo entre neuroinflamação, estresse oxidativo e condições como depressão e ansiedade. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em modelos animais e pacientes com esses transtornos podem induzir apoptose em células neuronais. Nesse contexto, as PC12 podem ser usadas para investigar esses efeitos em ambiente controlado (Petsouki et al., 2023). Evidências indicam que mediadores inflamatórios e estresse oxidativo influenciam a disponibilidade de neurotransmissores e a neuroplasticidade nas PC12, simulando problemas observados na depressão (Cheng *et al.*, 2019). Por exemplo, células PC12 expostas a citocinas

pró-inflamatórias apresentaram alteração no funcionamento do glutamato (Magdaleno; González, 2024).

A disfunção mitocondrial também participa de diversos transtornos neurodegenerativos, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington. Nesse contexto, ela provoca aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução da síntese de ATP e morte neuronal subsequente (Kansakar *et al.*, 2025; Paß *et al.*, 2021). Estudos com modelos neuronais, incluindo PC12, mostraram que a exposição a agentes neurotóxicos, como 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) e A β , resulta em disfunção mitocondrial que contribui para apoptose e neurodegeneração (Motori *et al.*, 2020; Paß *et al.*, 2021).

Além disso, alterações mitocondriais influenciam a gravidade e manifestação da ansiedade e depressão. Por exemplo, em modelo animal de estresse crônico, o comprometimento mitocondrial no hipocampo foi relacionado ao aumento da suscetibilidade a comportamentos ansiosos e depressivos (Tang *et al.*, 2019). A terapia eletroconvulsiva (ECT), empregada em casos de depressão severa, foi capaz de restaurar o metabolismo energético mitocondrial, destacando a importância da função mitocondrial nesses transtornos (Du *et al.*, 2025).

1.6 Lipopolissacarídeo – LPS

Diversos modelos *in vitro* para investigar mecanismos associados a transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos utilizam o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Este composto integra a membrana externa de bactérias Gram-negativas, é altamente imunogênico e ativa receptores de reconhecimento de patógenos, especialmente o Toll-like receptor 4 (TLR4) (Gowing *et al.*, 2019).

O LPS é capaz de induzir estresse oxidativo em diferentes tipos celulares, incluindo células PC12 e astrócitos. Em células PC12, a exposição ao LPS desencadeia uma cascata de eventos celulares que culmina em estresse oxidativo. Esse processo ocorre, em parte, pela ativação do TLR4, que promove a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e a subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS, por sua vez, danificam lipídios, proteínas e DNA, podendo levar à morte celular caso o estresse exceda a capacidade antioxidante da célula (Li; Zhang; Wang, 2020).

Nos astrócitos, o LPS também induz estresse oxidativo e uma resposta inflamatória robusta. Embora geralmente mais resistentes ao estresse oxidativo em comparação a outros tipos celulares, os astrócitos tornam-se altamente reativos em ambientes pró-inflamatórios, um

fenômeno conhecido como astrogliose. Nesse contexto, o LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e de ROS, incluindo óxido nítrico (NO) (Xian et al., 2019). A ativação crônica dos astrócitos por LPS contribui para um estado de estresse oxidativo persistente, com potencial para dano neuronal (Loureiro et al., 2012).

Evidências indicam que os astrócitos são capazes de produzir quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do TLR4 por LPS estimula vias de sinalização inflamatórias, especialmente a da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK) e a do fator nuclear kappa B (NF- κ B), levando à liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 beta (IL-1 β), exacerbando a neuroinflamação (Guerra et al., 2011; Lu et al., 2010; Sun et al., 2025). Nesse cenário, as células PC12 constituem um modelo relevante para investigar os efeitos neurotóxicos dessas citocinas. Estudos demonstram que a exposição de células PC12 ao TNF- α induz apoptose e reduz a proliferação celular, reforçando a associação entre mediadores inflamatórios derivados de astrócitos e a viabilidade neuronal (Chistyakov et al., 2014). Além disso, as células PC12 também produzem citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS. A ativação via TLR4 promove a liberação de TNF- α e IL-6, além de induzir apoptose neuronal (Xie et al., 2018; Zhong et al., 2015).

A ativação de vias inflamatórias em astrócitos expostos ao LPS pode levar à apoptose, o que intensifica o ambiente inflamatório no sistema nervoso central (SNC). Esse processo pode resultar na liberação de fatores tóxicos que afetam neurônios vizinhos (Sun et al., 2016). De fato, estudos mostram que a produção de NO e citocinas como TNF- α e IL-1 β por astrócitos ativados está associada à apoptose em células PC12 (Huang et al., 2025). Essas células também podem entrar em vias apoptóticas diretamente após a exposição ao LPS, principalmente por mecanismos mediados por ROS (Huang et al., 2025).. Adicionalmente, o LPS ativa a proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) em células PC12, promovendo a sua apoptose (Chen et al., 2013).

Em contextos de inflamação intensa, como a provocada pelo LPS, os astrócitos podem apresentar tumescência devido ao aumento da captação mitocondrial de Ca^{2+} , relacionado à desregulação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), e alterações no equilíbrio iônico celular. Esse tumescência contribui para o edema cerebral e compromete a saúde neuronal (Jayakumar et al., 2012). Há evidências de que a tumescência astrocitário está associado à disfunção mitocondrial e subsequente morte neuronal (Lei et al., 2024).

As células PC12 também sofrem alterações mitocondriais sob estímulos inflamatórios. A exposição ao LPS induz disfunção mitocondrial, caracterizada por despolarização do

potencial de membrana e tumescência mitocondrial (Kwan et al., 2020; Zhang et al., 2021). Essa disfunção prejudica a produção de ATP e eleva a geração de ROS, contribuindo para a indução da apoptose neuronal (Zhang et al., 2021).

1.7 Colchicina

A colchicina é um alcaloide natural derivado principalmente de espécies vegetais pertencentes à família *Colchicaceae*. O *Colchicum autumnale* (Figura 6), popularmente conhecido como açafrão-do-outono ou açafrão-dos-prados, é a fonte mais conhecida de colchicina, sendo a principal planta a partir da qual essa substância foi isolada para uso terapêutico (Elsewedy et al., 2021; Manzoor et al., 2018). Diversas partes da planta contêm colchicina, porém ela se encontra predominantemente em seus cormos, e em menor grau nas folhas e sementes (Çankaya; Bulduk; Çolak, 2019; Falahianshafiei et al., 2023).

Outra fonte significativa de colchicina é a *Gloriosa superba* (Figura 7) conhecida como lírio-de-chama, uma planta reconhecida por suas propriedades ornamentais e medicinais. Evidências apontam que suas raízes e tubérculos possuem quantidades expressivas de colchicina, despertando interesse por seus potenciais aplicações terapêuticas (Pandey et al., 2014; Rahmawati et al., 2018).

Figura 6 - *Colchicum autumnale* L. (Açafrão-do-outono).



Legenda: Imagem representativa do Açafrão-do-outono, planta pertencente à família *Colchicaceae* que contém quantidade significativa de colchicina em seus cormoscom. Imagem adaptada de Native Plant Trust – Go Botany. Disponível em <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/colchicum>.

Figura 7 - *Gloriosa superba* (Lírio-de-chama).



Legenda: Imagem representativa do Lírio-de-chama, planta ornamental e medicinal com concentração significativa de colchicina em suas raízes e tubérculos, pertencente à família Colchicaceae. Imagem adaptada de Wisconsin Horticulture – University of Wisconsin-Madison. Disponível em <https://hort.extension.wisc.edu/articles/gloriosa-lily-gloriosa-superba/>.

O uso terapêutico da colchicina teve início na Antiguidade, principalmente para o tratamento da gota. É atribuído aos gregos antigos o primeiro uso documentado dessa substância com essa finalidade, destacando-se Hipócrates, que defendia seu uso em doenças inflamatórias por volta de 400 a.C. A planta *Colchicum autumnale*, da qual a colchicina é extraída, é utilizada na medicina popular há séculos, especialmente na Europa, onde suas propriedades anti-inflamatórias são reconhecidas (Leung; Yao Hui; Kraus, 2015).

Atualmente, há outras indicações clínicas além da gota. A colchicina é empregada na febre familiar do Mediterrâneo, uma doença inflamatória hereditária caracterizada por serosite e febre recorrente, na qual é considerada tratamento de primeira linha. Seu uso contribui para o controle dos sintomas e prevenção da amiloidose, uma complicação grave da doença (Dasgeb et al., 2018). A colchicina também é utilizada no tratamento da pericardite aguda e recorrente. Suas propriedades anti-inflamatórias auxiliam na redução da inflamação cardíaca, aliviando sintomas e prevenindo complicações. Ensaios clínicos demonstram que a colchicina reduz significativamente as taxas de recorrência da pericardite (Lavanya; Sathyamurthy, 2023; Roubille et al., 2013; Yan; Tan, 2017).

Evidências sustentam o uso da colchicina na prevenção da ocorrência ou recorrência de fibrilação atrial, especialmente após cirurgias cardíacas ou ablações. Seu efeito anti-

inflamatório reduz a carga inflamatória envolvida no desenvolvimento da fibrilação atrial (Lavanya; Sathyamurthy, 2023). Além disso, a colchicina tem sido estudada no contexto da doença arterial coronariana, demonstrando redução de eventos cardiovasculares e inflamação associada à aterosclerose (Li et al., 2021b). Ensaios clínicos randomizados apontam que baixas doses de colchicina podem reduzir eventos adversos graves (D’Amario et al., 2021).

Devido às suas propriedades anti-inflamatórias, investigou-se seu uso no tratamento da COVID-19, com o objetivo de atenuar a resposta inflamatória exacerbada (tempestade de citocinas) observada nos casos graves. Ensaios clínicos indicam que a colchicina pode reduzir a mortalidade e hospitalizações associadas à COVID-19 (Lebedev et al., 2021). Em síntese, a colchicina é empregada em diversos contextos clínicos devido às suas propriedades anti-inflamatórias, extrapolando sua indicação inicial para gota.

Seu efeito anti-inflamatório decorre de diversos mecanismos interligados. Inicialmente, ela promove a desestabilização da rede microtubular ao se ligar à tubulina, componente proteico essencial dos microtúbulos. Essa ligação impede a polimerização da tubulina, desestabilizando os microtúbulos. Como consequência, processos celulares como transporte intracelular, manutenção da morfologia e mitose são prejudicados (Figura 9) (Weng et al., 2021).

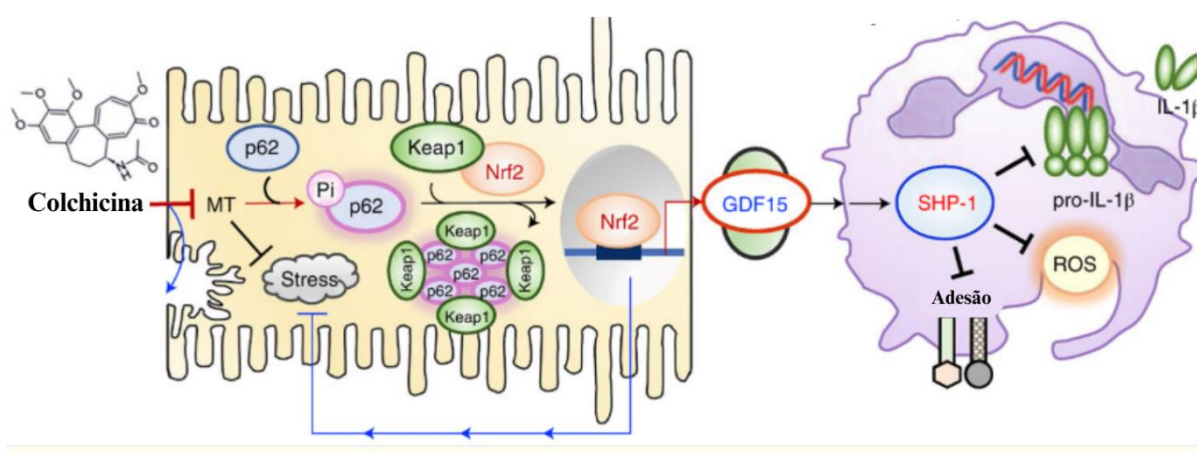
Em células imunes, como neutrófilos e macrófagos, essa desestabilização compromete funções essenciais à resposta inflamatória, como adesão celular, migração e fagocitose (Deftereos et al., 2013; Zhang et al., 2022a). A colchicina inibe o rolamento e a adesão dos neutrófilos ao endotélio, além de reduzir sua migração em direção a estímulos inflamatórios. Essa modulação é importante para evitar danos teciduais excessivos durante a inflamação (Angelidis et al., 2018; Fine et al., 2020).

Adicionalmente, a colchicina inibe o inflamassoma NLRP3, componente chave da imunidade inata responsável pela ativação e liberação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-1 β . Dessa forma, a colchicina reduz a produção dessa citocina ao inibir a ativação e montagem do inflamassoma (Eliseev et al., 2024; Mondeshki; Mitev, 2024). A colchicina também reduz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B, o qual regula a expressão de diversos mediadores inflamatórios (Angelidis et al., 2018; Zhang et al., 2022a).

Embora inicialmente se acreditasse que esses efeitos ocorriam diretamente nas células imunes, estudos indicam que as concentrações plasmáticas obtidas após administração de doses seguras são insuficientes para tal efeito direto (Eliseev et al., 2024). Evidências sugerem que a colchicina atua indiretamente via hepatócitos. Nesses, promove a desestabilização dos microtúbulos, o que, em baixas concentrações, é tolerado. Esse efeito ativa uma autofagia

seletiva dependente de SQSTM1/p62, resultando na degradação do Keap1, principal inibidor do Nrf2. Com a degradação de Keap1, o Nrf2 é ativado, regulando processos relacionados ao estresse oxidativo, inflamação e função mitocondrial (Figura 9) (Weng et al., 2021).

Figura 8 – Mecanismo de ação da colchicina — ativação indireta de Nrf2 devido à desestabilização de microtúbulos.



A desestabilização dos microtúbulos desencadeada pela colchicina ativa o Nrf2 via degradação de Keap1, induzindo GDF15, que inibe a ativação de células mieloides por meio da SHP-1 (Weng et al., 2021).

O Nrf2 ativado estimula a produção do fator de crescimento GDF15, que atua nas células mieloides. A ativação dessas células pode ser modulada por receptores de superfície que sinalizam para a proteína tirosina fosfatase SHP-1. O GDF15, induzido pela colchicina, regula positivamente a SHP-1, inibindo a ativação das células mieloides (Weng et al., 2021).

Além dos hepatócitos, células do sistema nervoso central (SNC), como micróglias, astrócitos e neurônios, também expressam Nrf2, em níveis mais elevados nas micróglias e astrócitos, e menores nos neurônios. A expressão de Keap1, supressor do Nrf2, é semelhante entre essas células (Heurtaux et al., 2022).

Estudos demonstram que a colchicina atravessa a barreira hematoencefálica (BBB) e atinge o SNC, especialmente o hipocampo (Evrard et al., 1998), embora em quantidades reduzidas devido à ação da glicoproteína-P (Avdeef et al., 2001; Chishty et al., 2001; Matheny et al., 2001; Saleh et al., 2023). Por meio de microdialise, Evrard et al., (1998) mostraram que, após quatro horas de administração intravenosa de colchicina, sua concentração no líquido extracelular hipocampal (ECF) correspondia a 14% da concentração plasmática, e no espaço

intracelular hipocampal (EIH) era dez vezes maior que no ECF. Além disso, a concentração de colchicina no hipocampo era 2,8 vezes maior do que em outras áreas cerebrais.

Diante dessas evidências, considerando que a colchicina ativa o Nrf2 via desestabilização dos microtúbulos, que ela atravessa a BBB, e que micróglia, astrócitos e neurônios expressam Nrf2 e Keap1, o objetivo deste trabalho foi verificar se concentrações baixas e não tóxicas de colchicina, um ativador de Nrf2 em hepatócitos, poderiam promover efeitos antioxidante e anti-inflamatório, regular a atividade e estrutura mitocondrial, bem como os processos de apoptose e morte celular em células do sistema nervoso central, como astrócitos e células PC12.

2 JUSTIFICATIVA

A elevada prevalência dos transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão, representa um sério problema de saúde pública, impactando significativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Apesar da ampla disponibilidade de medicamentos, uma proporção expressiva de pacientes permanece refratária às terapias convencionais, demonstrando resposta clínica insatisfatória (Eskandari et al., 2025). Paralelamente, doenças neurodegenerativas como Alzheimer (DA), Parkinson (DP) e Huntington (DH) envolvem mecanismos fisiopatológicos complexos, sendo que até o momento não existem terapias eficazes capazes de modificar o curso dessas doenças (Eskandari et al., 2025; Kakoti; Bezbaruah; Ahmed, 2022).

Nesse contexto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e acessíveis torna-se urgente. A descoberta e desenvolvimento de novas moléculas, embora desejáveis, é um processo demorado, oneroso e frequentemente associado a elevadas taxas de insucesso. Assim, o reposicionamento de fármacos desponta como uma estratégia promissora, pois utiliza compostos com perfil de segurança já estabelecido, reduzindo o tempo e o custo necessários para sua aplicação clínica (Bassi et al., 2024; Bhat et al., 2021; Zheng et al., 2025).

Tanto os transtornos psiquiátricos quanto os neurodegenerativos compartilham alterações fisiopatológicas relevantes, como estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e morte celular. Dessa forma, fármacos capazes de atuar simultaneamente sobre esses processos tornam-se particularmente atraentes como candidatos terapêuticos. O fator de transcrição Nrf2 é um regulador chave dessas vias, promovendo a expressão de enzimas antioxidantes, controlando a inflamação e preservando a função mitocondrial.

A colchicina, tradicionalmente utilizada no tratamento da gota e de doenças inflamatórias como a febre familiar do Mediterrâneo e a pericardite recorrente, tem demonstrado potencial para modular essas vias por meio da ativação indireta do Nrf2. Estudos indicam que, mesmo em baixas concentrações, a colchicina promove a desestabilização dos microtúbulos e a subsequente degradação de Keap1, o que leva à ativação do Nrf2 e à transcrição de genes citoprotetores. Embora esses efeitos tenham sido descritos principalmente em hepatócitos, há evidências de que a colchicina atravessa a barreira hematoencefálica e atinge o sistema nervoso central (Evrard *et al.*, 1998; Avdeef *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2019), justificando a investigação de seus efeitos em células como astrócitos e neurônios.

Considerando que astrócitos e células PC12 são modelos amplamente utilizados para o estudo da neuroinflamação e do estresse oxidativo, especialmente quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), torna-se relevante avaliar se a colchicina poderia modular tais processos nesses tipos celulares. Essa abordagem permite compreender se os efeitos já relatados em outros tecidos se reproduzem no sistema nervoso, contribuindo para a elucidação de possíveis novas aplicações terapêuticas da colchicina no contexto de doenças neurológicas.

Dessa forma, torna-se relevante investigar se a colchicina, em baixas concentrações não tóxicas, pode modular respostas oxidativas, inflamatórias e mitocondriais em astrócitos e células PC12 expostas ao LPS, contribuindo para a validação do seu potencial neuroprotetor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial da colchicina em reverter alterações moleculares — estresse oxidativo, liberação de citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial; induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 em linhagens de astrócitos e PC12 (Feocromocitoma).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar concentrações não tóxicas de colchicina em linhagens celulares de astrócitos e PC12;
- Avaliar o potencial da colchicina na modulação do estresse oxidativo em meio condicionado (extracelular) utilizando as linhagens celulares astrócitos e PC12;
- Avaliar o potencial da colchicina na modulação do estresse oxidativo citoplasmático nas linhagens celulares de astrócitos e PC12;
- Avaliar a capacidade da colchicina em modular o potencial transmembrânico mitocondrial nas linhagens de astrócitos e PC12;
- Avaliar o potencial da colchicina em modular os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β em homogenato celular e meio condicionado nas linhagens de astrócitos e PC12;
- Analisar o efeito da colchicina sobre a tumescência mitocondrial em astrócitos e células PC12

4 METODOLOGIA

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 *Linhagens celulares*

As linhagens celulares utilizadas para os testes foram células murinas de PC12 (feocromocitoma) (Rio de Janeiro, RJ, BRA) e astrócitos doados pela Universidade de São Paulo-UNIFESP). Ambas as linhagens são células imortalizadas.

4.1.2 *Manutenção das linhagens celulares*

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de células. Foram empregados frascos de cultura de dois tamanhos, uma delas com 25 cm² por 50 mL de volume, uma outra com 75 cm² por 250 mL de volume. O meio de cultura usado para as duas linhagens celulares foi *Dulbecco's Modified eagle Medium* (DMEM- ThermoFisher[®]) suplementado à 10% com Soro Fetal Bovino (SBF) (SFB, Gibco[®]). A manutenção e plaqueamento das células foram realizados em utilizando uma câmara de fluxo laminar vertical (*Laminar Flow Cabinet - ESCO[®]*). As culturas celulares foram incubadas a 37 °C, em atmosfera controlada com 5% de CO₂, em incubadora de CO₂ (MOC-18ACL-PA - *Panasonic Healthcare Corporation of North America[®]*). O crescimento das linhagens era acompanhado diariamente por microscópio (*Nikon Eclipse ti – Spectrum Bio Engenharia Médica Hospitalar Ltda*), de forma que a manutenção era feita sempre que a confluência das células fosse de aproximadamente 70%.

Para a manutenção das células aderentes, o meio de cultura da garrafa era retirado, o fundo e as laterais da garrafa eram lavados com *Phosphate Buffer Solution* (PBS) estéril (3 mL: Garrafa de 25 cm²; 5 mL: Garrafa de 75cm²) para remoção de restos celulares e excesso de SBF. Depois disso, o PBS era descartado e a tripsina-EDTA 0,5% (Gibco[®]) 1X (0,5 mL: Garrafa de 25 cm²; 1 mL: Garrafa de 75 cm²) era adicionada com a finalidade de desprender as células que estavam aderidas. Após período de incubação com a tripsina, ela era inativada por meio da adição de meio de cultura suplementado com SBF. Nesse sentido, parte das células eram removidas, sendo a outra parte mantida na garrafa e sendo adicionada de meio de cultura para manter o cultivo.

4.1.3 Avaliação da viabilidade celular

4.1.3.1 Princípio do teste de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium)

Trata-se de um teste que mede a viabilidade celular por meio da atividade metabólica de uma célula saudável. Nesse ensaio, as células tratadas foram expostas a um corante ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide – MTT) que tem inicialmente uma cor amarela. Por meio da atividade mitocondrial, as células viáveis são capazes de reduzir o MTT a *formazan*, um composto insolúvel de coloração roxa. Para quantificação, o formazan é posteriormente dissolvido com o uso de uma substância adequada, como o dimetilsulfóxido (DMSO). Após solubilização, os valores de absorbância são medidos em leitor de microplacas. Dessa forma, a viabilidade celular é avaliada de forma indireta, com base nos valores de absorbância obtidos, que refletem a atividade metabólica das células viáveis responsáveis pela formação de formazan (Mosmann, 1983).

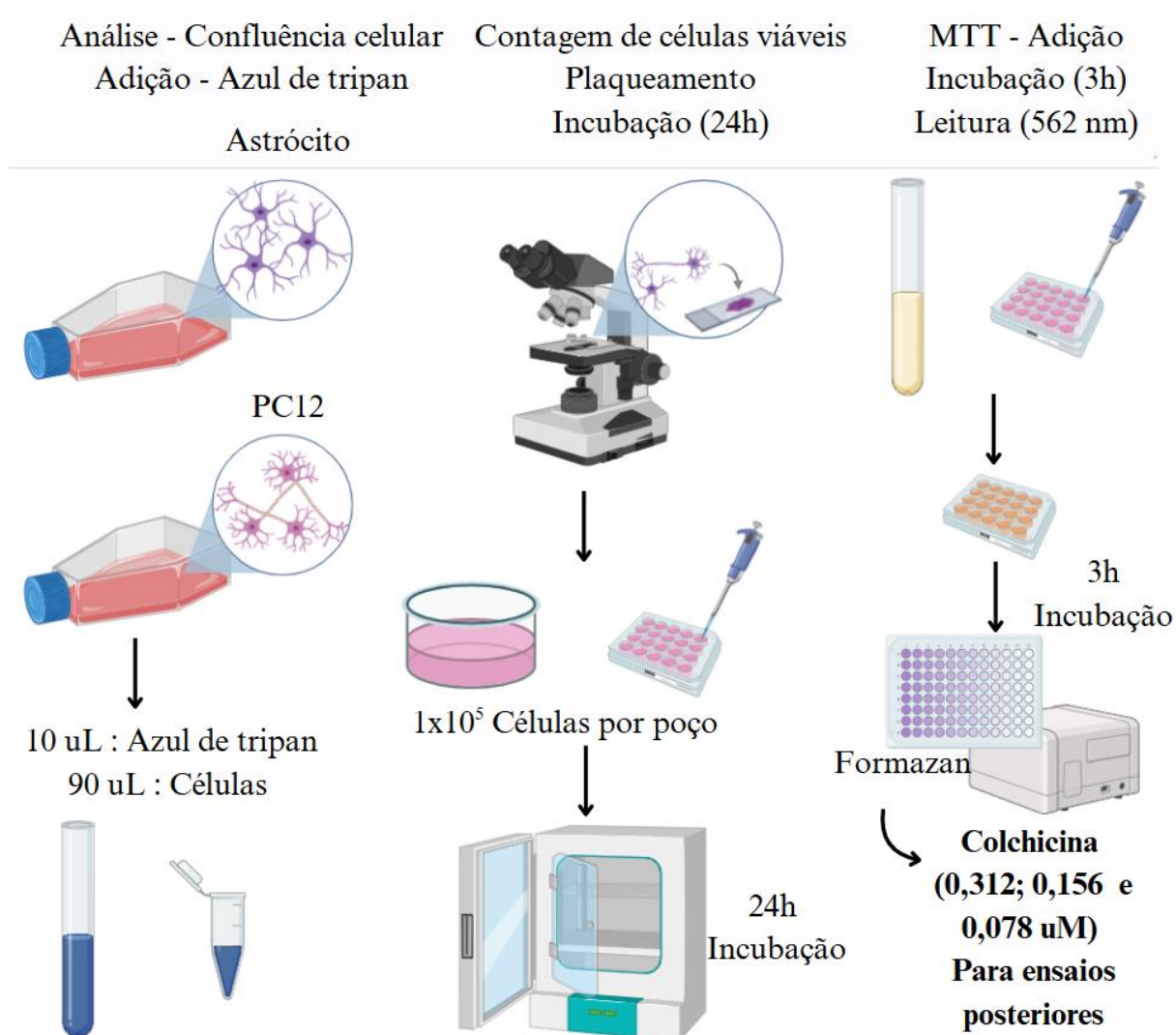
4.1.3.2 Procedimento Experimental

Após o processo de suspensão das células, estas foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas por 24h a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO₂, de forma a ter no poço uma concentração de células de 1 x 10⁵ células/mL. Depois o período de incubação, as células foram expostas diluição seriada em fator 2 da colchicina (10 – 0,039 µM) (Bettiol et al., 2021; Pappritz et al., 2022), sendo cada concentração considerada um grupo experimental distinto.

Em seguida, as placas foram centrifugadas a 2800 rpm, 25 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os poços, contendo as células aderidas, foram lavados duas vezes com PBS não estéril. Logo após, adicionando-se a solução de MTT a 0,25 mg/mL, e as placas foram incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período, realizou-se nova centrifugação (2800 rpm, 25 °C, por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e DMSO puro foi adicionado para solubilização dos cristais de formazan.

As placas permaneceram sob agitação por 30 minutos, e então foi realizada a leitura da absorbância a 562 nm utilizando o leitor Biotek Eon. A viabilidade celular foi calculada com base nos valores de absorbância obtidos (Figura 9) (Mosmann, 1983).

Figura 9 - Esquema simplificado do ensaio do MTT para determinar concentrações não tóxicas de colchicina que foram empregadas em ensaios posteriores.



Esquema simplificado do ensaio do MTT para determinar concentrações não tóxicas de colchicina que foram empregadas em ensaios posteriores. Elaborado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canva.

4.1.3.3 Análise dos dados

Os dados foram analisados com o *GraphPad Prism* 10.1.0. Os valores foram normalizados, de forma que a média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100%. Além disso, a porcentagem de inibição foi determinada para as diferentes concentrações/grupos de colchicina, a partir dos valores de absorbância obtidos, utilizando como base os valores do grupo controle. Com isso, foi visualizada a Concentração Inibitória Média (CI50) com os seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) por regressão não linear. Além do mais, foi possível visualizar quais concentrações de colchicina não alteraram

de forma significativa a viabilidade celular, comparando os percentuais de inibição do grupo controle com os percentuais de inibição dos demais grupos.

4.1.4 Plaqueamento, exposição à LPS e tratamento com Colchicina

4.1.4.1 Plaqueamento

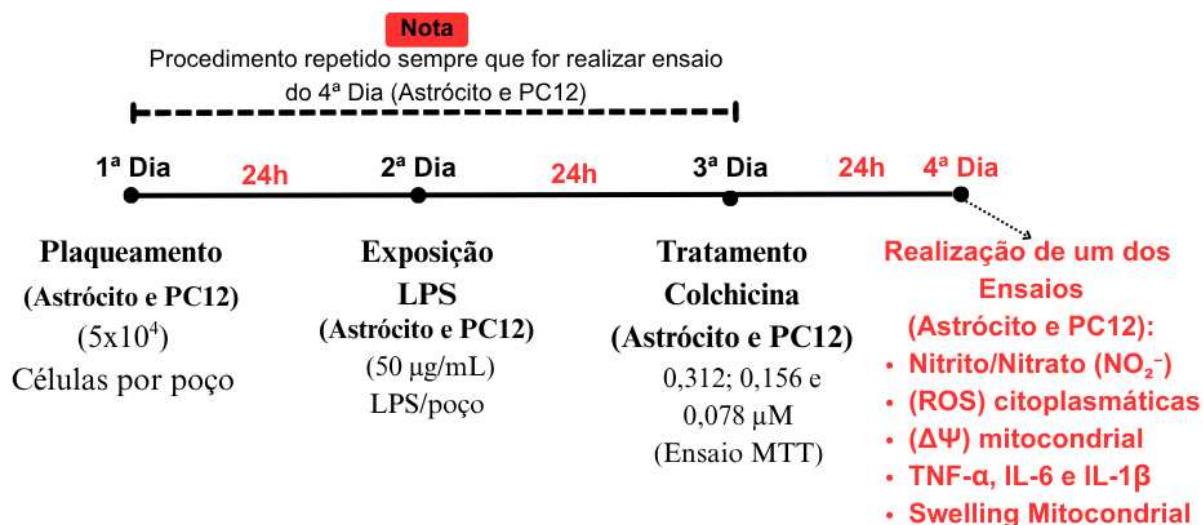
O protocolo de plaqueamento, exposição ao LPS e à Colchicina foi adaptado a partir de estudos prévios do presente grupo de pesquisa (Capibaribe, 2024; Rebouças, 2024) (Figura 11). Para o plaqueamento, considerou-se o protocolo de manutenção de células aderidas (item 3.2.2) e realizou-se o teste de viabilidade por azul de tripan, no qual foram retirados 90 μL da suspensão de células obtidas, para receberem 10 μL do azul de tripan, o qual permite diferenciar célula viável (Brilhosa e transparente) de uma célula não-viável (Coloração azul), de forma que somente as viáveis eram contadas na câmara de Neubauer. Assim, a concentração de células da suspensão de células era calculada, para em seguida serem colocadas em placa de 24 poços, com cada poço tendo uma concentração 5×10^4 de células/mL. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h a 37 °C, com 5% de CO_2 .

Após esse período de 24h de incubação, era adicionado LPS aos respectivos poços, de forma que, após adição, fosse atingida uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de LPS no poço. Preparava-se uma solução estoque de LPS 1 mg/mL com PBS estéril, a partir da qual adicionava à placa de 24 poços. Com o término da adição de LPS, a placa era homogeneizada cuidadosamente 20x, para que em seguida fosse colocada na incubadora, onde permanecia por mais 24h até o tratamento com a colchicina.

Decorridas as 24h de exposição ao LPS, as células foram tratadas com a colchicina, nas concentrações finais de 0,31, 0,17, 0,08 μM , considerando cada concentração como um grupo experimental distinto. Para a preparação da solução de colchicina, utilizou-se a formulação comercial Colchis® 0,5 mg, um comprimido foi triturado e o pó resultante foi dissolvido em 10 mL de DMSO, formando uma solução amarelada. Esta solução era posteriormente filtrada utilizando filtro de seringa com membrana de 0,22 μm . O filtrado era então diluído e adicionado aos respectivos poços da placa. Após a adição, a placa era novamente homogeneizada cuidadosamente 20 vezes e incubada por mais 24 horas.

Finalizado esse período, eram realizados os procedimentos experimentais (Figura 10).

Figura 10 - Fluxograma do processo de Plaqueamento, exposição à LPS e tratamento com colchicina.



Fonte: Fluxograma do processo de Plaqueamento, exposição à LPS e tratamento com colchicina. Elaborado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canva (2025).

4.1.5 Avaliação da produção de Nitrito/Nitrato (NO_2^-) em meio condicionado

4.1.5.1 Princípio do Teste

Foi utilizado o método de *Griess* para a determinação dos níveis de nitrito e nitrato (NO_2^-). O nitrato (NO_3^-) presente na amostra é inicialmente reduzido a nitrito (NO_2^-) por meio de um agente redutor, como cloreto de vanádio (III), zinco metálico ou enzimas contendo nitrato redutase (Pai et al., 2021; Wang et al., 2016). Na presença de NO_2^- , adiciona-se o reagente de *Griess*, composto por sulfanilamida e N-(1-naftil)etilenodiamina (NED). Em meio ácido, o nitrito reage com a sulfanilamida formando um sal de diazônio, que, por sua vez, acopla-se ao NED, originando um corante azo de coloração intensa (Catini et al., 2022; Spryn; Sabadashka; Sybirna, 2021) et al., 2022). A intensidade da cor gerada é proporcional à concentração de NO_2^- na amostra, sendo esta quantificada por espectrofotometria na faixa de comprimento de onda entre 540 e 548 nm (Giovannoni et al., 1997; Sun et al., 2003).

4.1.5.2 Procedimento Experimental

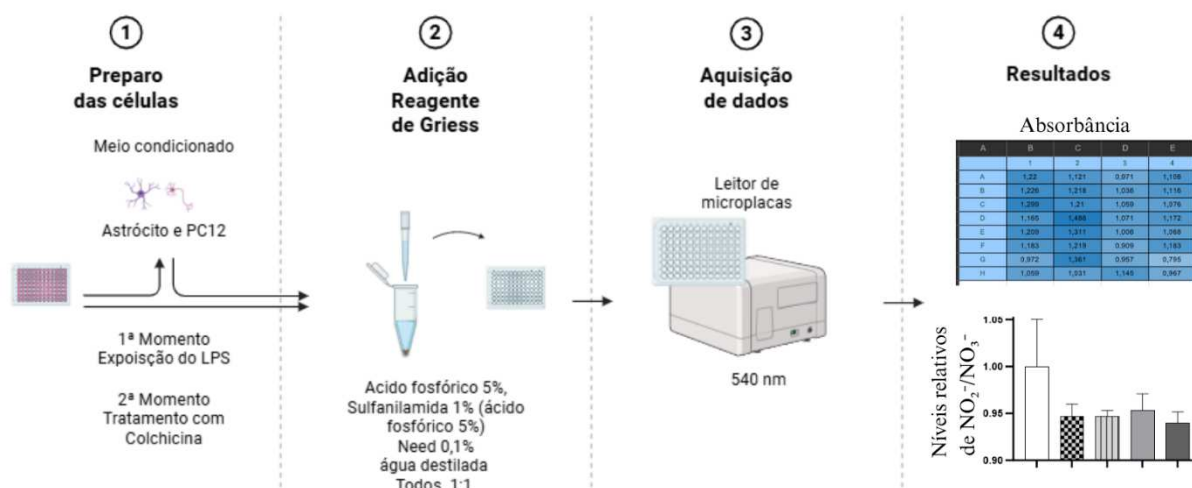
A amostra utilizada foi o meio condicionado, após plaqueamento e exposição a LPS (1ª Momento - LPS 24 h) e a Colchicina (2ª Momento - 24h LPS + 24h Col) (Figura 12). Para esse experimento, foi empregado o reagente de *Griess*, que consiste em Ácido fosfórico 5%, Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, Need (*N-1-Naphtylethylenediamina*) 0,1% e água destilada, todos na proporção de 1 para 1, preparado no momento de uso da solução. Para os padrões, foram pesados 35 mg de NaNO_2 , dissolvendo-o em 50 mL de água *Milliq*. A partir dessa solução, foi feita uma diluição em 50x para obter o primeiro ponto da curva padrão de NaNO_2 , sendo os demais pontos obtidos por diluição seriada (1:2) (NaNO_2 : 2-0,001953 μM), preparados em microtubos (Eppendorf®) e utilizando meio de cultura não estéril como solvente. O Branco consistiu em meio de cultura não-estéril, formando o 12º da curva-padrão. Foi adicionado 50 μL dos padrões, branco e da amostra, nesta ordem, a uma placa de 96 poços. Depois, 50 μL do reagente de *Griess* foi adicionado aos respectivos poços, sendo a placa incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Ao término, foi feita a leitura em um leitor de microplaca (*BioTek Eon*) a 540 nm (Green et al., 1982).

4.1.5.3 Análise dos dados

Com os valores de absorbância obtidos na leitura dos padrões, cujas concentrações eram conhecidas, foi plotada uma curva padrão em um gráfico de eixo XY, no qual os valores de absorbância dos padrões e das amostras ficaram no eixo y, enquanto a concentração do analito ficou no eixo x. Dessa forma, sabendo-se a concentração e o respectivo valor de absorbância do padrão, foi determinada a equação da reta desse gráfico XY. Em seguida, utilizando os valores de absorbância da amostra e a equação da reta, os níveis de (NO_2^-) das amostras foram calculados. Esses últimos valores foram colocados no *GraphPad Prism 10.1.0* para análise estatística e elaboração dos gráficos.

Figura 11 - Fluxograma acerca da execução do ensaio de avaliação dos níveis de nitrito em meio condicionado de astrócitos e células PC12.

Avaliação dos níveis de Nitrito (NO_2^-) em meio condicionado



Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canvas (2025).

4.1.6 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) citoplasmáticas

4.1.6.1 Princípio do teste

Baseia-se na detecção de ROS por meio da conversão de um composto não fluorescente, o diacetato de diclorodí-hidrofluoresceína (DCFH-DA), em um derivado fluorescente, a diclorofluoresceína (DCF), na presença de ROS. DCFH-DA é permeável às células, difundindo-se para o interior das células com facilidade. Após isso, as esterases celulares clivam os grupos diacetato, convertendo-os em DCFH, todavia não fluorescente. A presença de ROS em condições de estresse oxidativo, como (H_2O_2) ou superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxidam DCFH em DCF, acarretando emissão de fluorescência verde (De Haan et al., 2022; Reiniers et al., 2021). A oxidação ocorre principalmente por conta de estímulos externos que provocam estresse oxidativo ou por ROS geradas a processos metabólicos intracelulares (Gonzalez et al., 2020). Essa conversão de DCFH em DCF permite quantificar o estresse oxidativo através da análise, em citometria de fluxo, da intensidade de fluorescência emitida. Células com aumento de estresse oxidativo possuem níveis altos de fluorescência, ao passo que células com baixo nível

de estresse oxidativo possuem baixo nível de fluorescência (Karlsson et al., 2010; Wan et al., 2005).

4.1.6.2 Procedimento Experimental

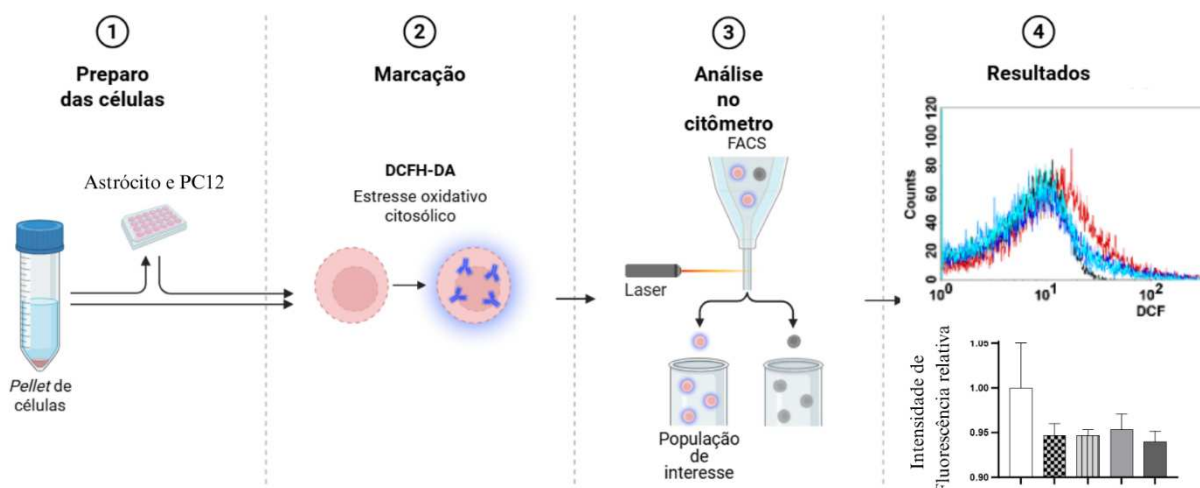
A incorporação de DCFH-DA foi feita em ambiente estéril. Para isso, foi preparada uma solução de DCFH-DA em DMSO 1 mg/mL, a partir da qual adicionou-se 10 µL aos respectivos poços. Isso foi realizado 3h após o término da exposição das células a colchicina. Em seguida, a placa foi incubada. Além disso, foi esperado 24h após término de exposição da colchicina para começar a leitura. O procedimento foi feito em ambiente não-estéril. Foi separado um microtubo de centrifugação (*Eppendorf*®) para cada poço da placa utilizado no experimento. Cada poço teve o seu meio de cultura removido e seu fundo lavado 3x com PBS não-estéril. Em cada etapa dessa, o conteúdo era transferido para o respectivo microtubo. Em seguida, era adicionado de tripsina-EDTA 0,5% (*Gibco*®) 1X, incubando-se por 5 minutos a 37 °C e inativando-se com o meio de cultura do próprio poço coletado anteriormente, devolvendo-se o material ao microtubo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 2800 rpm, 25 °C por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. PBS não-estéril foi adicionado ao pellet de células e uma nova centrifugação foi realizada, 2800 rpm, 25 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet de células ressuspensionado em 200 µL de PBS não-estéril para realizar leitura no citômetro FACSCalibur™. DCF - Excitação em 488 nm (laser azul) e detecção no pelo sensor FL1 530/30 (Figura 12) (Aranda et al., 2013).

4.1.6.3 Análise dos dados

A média da intensidade de fluorescência produzida pela formação de DCF foi coletada por meio do filtro de fluorescência verde. A partir desses valores de intensidade, foi feita a média geométrica, obtendo-se assim a intensidade relativa de fluorescência, de forma que o grupo controle recebeu valor aproximadamente 1, enquanto os demais grupos receberam valores proporcionais (Pokorný et al., 2014). Esses últimos valores foram colocados no *GraphPad Prism* 10.1.0 para análise estatística e elaboração dos gráficos.

Figura 12 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação de Estresse Oxidativo citoplasmático em astrócitos e células PC12.

Avaliação do Estresse Oxidativo citosólico por marcação com DCFH-DA



4.1.7 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

4.1.7.1 Princípio do teste

Baseia-se no uso de *Rhodamine 123* (Rh123), um marcador catiônico lipofílico fluorescente que se acumula em mitocôndrias ativas, uma vez que o potencial de membrana é negativo. Dessa forma, avalia-se a estrutura e função mitocondriais, uma vez que a diminuição do potencial de membrana é indicativo de disfunção ou apoptose. A Rh123 se acumula preferencialmente na matriz mitocondrial, tal acúmulo é provocado pelo gradiente eletroquímico através da membrana interna da mitocôndria, o que se denomina de potencial de membrana mitocondrial. A carga negativa dentro da mitocôndria, quando estrutura e atividades preservadas, atrai o Rh123 de carga positiva, provocando alta intensidade de fluorescência. De maneira contrária, níveis baixos de fluorescência ocorrem quando o potencial de membrana despolariza em decorrência da redução de captação da Rh123. (Chazotte, 2011; Deivasigamani et al., 2019; Duan et al., 2018; He et al., 2015; Zorova et al., 2022). Dessa forma, o citômetro mede a intensidade de fluorescência emitida por cada célula, sendo possível estimar a proporção

de mitocôndrias saudáveis e/ou comprometidas (Khanaychenko & Mukhanov, 2025; Vernier, 2011).

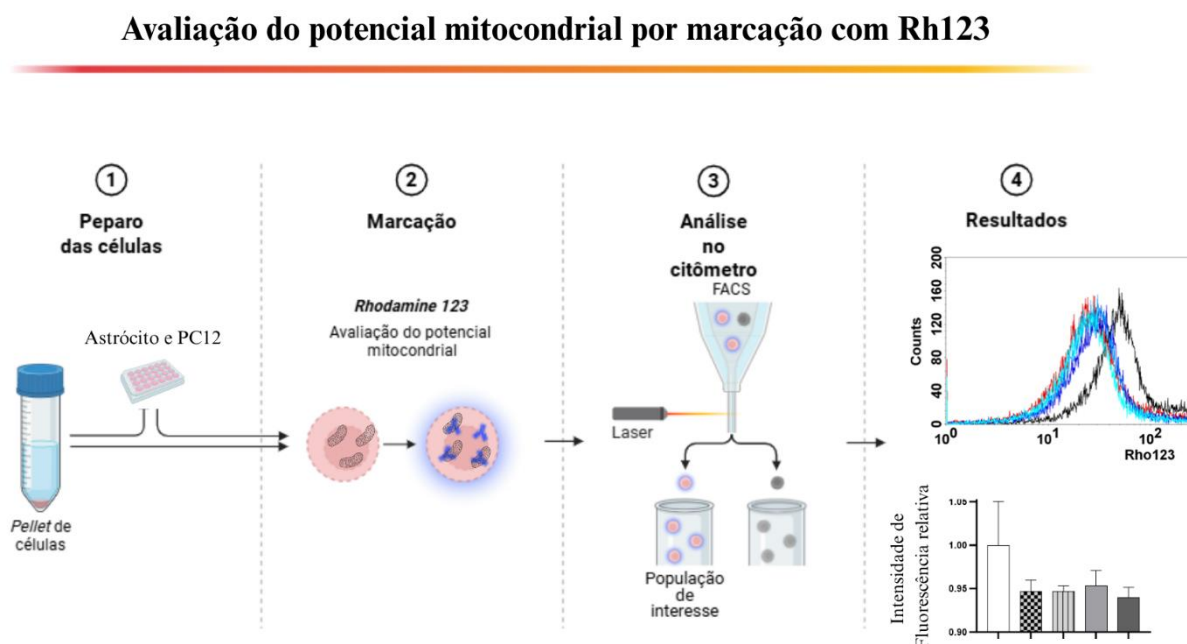
4.1.7.2 Procedimento Experimental

Preparou-se uma solução de Rh123 - *Rodamine* 123 (Rh123) (MERCK®, Darmstadt, Alemanha), em ambiente estéril. Para isso, a partir de uma solução estoque 5 mg/mL de, foi feita uma diluição com PBS estéril para 1 mg/mL. Para o processo e marcação (Figura 13), realizado em ambiente não estéril, foi separado um microtubo de centrifugação (Eppendorf®) para cada poço da placa utilizado no experimento. Cada poço teve o seu meio de cultura removido e seu fundo lavado 3x com PBS não-estéril. Em cada etapa dessa, o conteúdo era transferido para o respectivo microtubo. Em seguida, era adicionado de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco®) 1X, incubando-se por 5 minutos a 37 °C e inativando-se com o meio de cultura do próprio poço coletado anteriormente, devolvendo-se o material ao microtubo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 2800 rpm, 25 °C por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, o pellet de células ressuspensionado em 100 µL de PBS não estéril, para logo em seguida serem acrescidos de 1 µL da solução de Rh123 1 mg/mL. Após, isso os microtubos foram incubados em ambiente com baixa iluminação durante 30 minutos. Ao término, foram realizadas três centrifugações (2800 rpm, 5 minutos, 25 °C), sempre descartando o sobrenadante e acrescentando 300 µL de PBS não estéril ao pellet. Depois da última centrifugação, 200 µL de PBS não estéril foram acrescentados ao *pellet*, para realizar a leitura no citômetro FACSCalibur™. *Rhodamine* 123 - Excitação com 488 nm (laser azul) e detecção pelo sensor FL1 530/30 (Figura 13) (Rebouças, 2024).

4.1.7.3 Análise dos dados

A partir desses valores de intensidade, foi feita a média geométrica, obtendo-se assim a intensidade relativa de fluorescência, de forma que o grupo controle recebeu valor aproximadamente 1, enquanto os demais grupos receberam valores proporcionais (Pokorný *et al.*, 2014). Esses últimos valores foram colocados no *GraphPad Prism 10.1.0* para análise estatística e elaboração dos gráficos.

Figura 13 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação do potencial mitocondrial por meio da marcação com Rh123 em astrócitos e células PC12.



Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canvas (2025).

4.1.8 Avaliação dos níveis de $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 β em células e em meio condicionado

4.1.8.1 Princípio do teste

Os níveis das citocinas $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 β foi determinado por meio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* (Biolegend ELISA MAXTM Deluxe set). Esse kit contém um conjunto de reagentes e soluções essenciais para um ensaio de ELISA sanduíche. As amostras empregadas nesse experimento foram o pellet de células e o meio condicionado, após plaqueamento e exposição a LPS e a colchicina. Nesse contexto, um anticorpo de captura monoclonal específico para $TNF-\alpha$, IL-6 ou IL-1 β é adicionado a placa de 96 poços. Solução padrão e amostras são adicionados aos poços da placa, assim as citocinas ($TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 β) ligam-se ao anticorpo de captura que está imobilizado na placa. Em seguida, é adicionado o anticorpo biotinizado monoclonal de detecção para $TNF-\alpha$, IL-6 ou IL-1 β , produzindo um “sanduíche” anticorpo-antígeno-anticorpo. Na sequência, o reagente *Avidin-HRP* é adicionado, logo depois também é adicionado *TMB substrate*, o que gera uma coloração azul de forma proporcional à concentração de citocinas presente no poço. Uma solução de parada é adicionada

para colocar fim a reação, com isso a coloração muda de azul para amarela. A absorbância nos poços foi lida em 450 nm com o uso de um leitor de microplaca (*BioTek EonTM*).

4.1.8.2 Procedimento Experimental

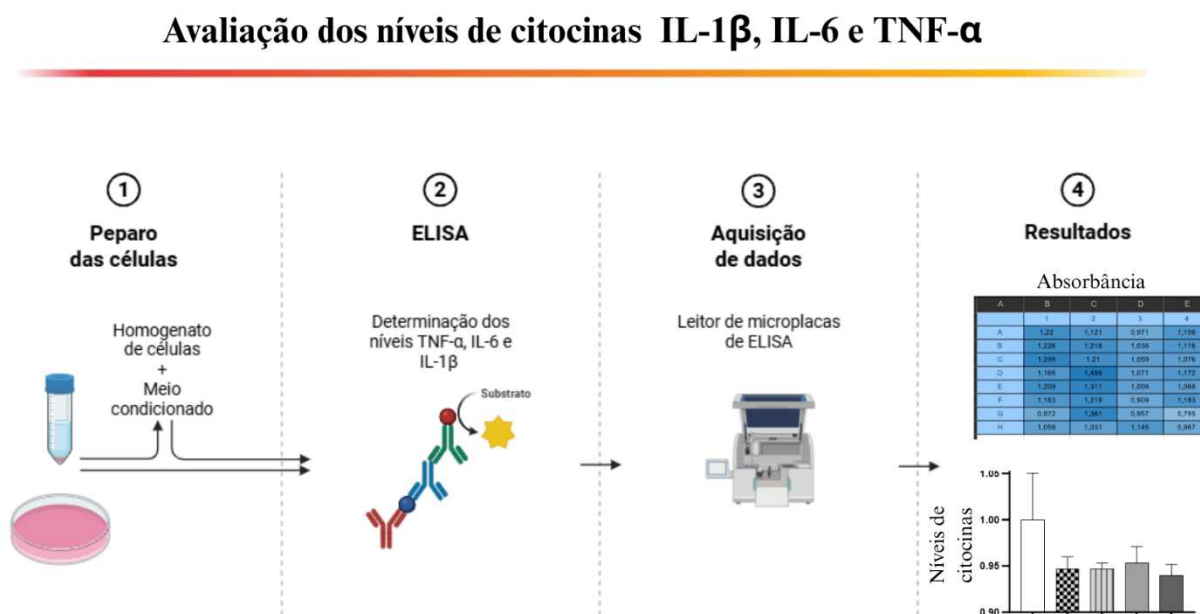
O experimento foi feito em ambiente não estéril, conforme o *datasheet* do kit de *ELISA* (*ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse, BioLegend[®]*), durante dois dias. No primeiro dia, a placa foi selada com o anticorpo de captura (100 µL), permanecendo sob selamento *overnight* na temperatura de 2-8 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada 4x com 300 µL de PBS 0,05% Tween-20. Todas as etapas de lavagem foram feitas com PBS 0,05% Tween-20, utilizando 300 µL. Em seguida, a placa foi bloqueada com 200 µL de *Assay Diluent A 1X*, selada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação (500 rpm). Foi feita novamente 4x a lavagem da placa, 100 µL dos padrões (TNF- α : 7,8-500 pg/mL; IL-6: 7,8-500 pg/mL; IL-1 β : 31,3-2000 pg/mL) e das amostras foram adicionados aos respectivos poços, sendo a placa selada e incubada a temperatura ambiente por 2 horas sob agitação (500 rpm). Realizou-se novamente 4x a lavagem da placa, 100 µL do anticorpo de detecção diluído foi adicionado aos respectivos poços, ao término, a placa foi selada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação (500 rpm). Novamente, a placa foi lavada 4x, 100 µL da solução de *Avidin-HRP* foi adicionado aos respectivos poços, a placa foi selada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação (500 rpm). Dessa vez, foi feita 5x a lavagem com PBS 0,05% Tween-20, porém agitando a placa de 30 segundos a 1 minuto entre cada lavagem. Logo depois, foi adicionado 100 µL do *TMB substrate* (TNF- α e IL-6: *TMB substrate*); IL-1 β : *Substrate A+Substrate B* 1:1) aos respectivos poços, a placa foi selada e incubada no escuro, a temperatura ambiente, por 20 minutos. 100 µL da solução de parada (H₂SO₄ 2 M) foi adicionado, realizando a leitura após 15 minutos em um leitor de microplaca (*BioTek EonTM*) em 450 nm (Figura 14).

4.1.8.3 Análise dos Dados

Com os valores de absorbância obtidos na leitura dos padrões, cujas concentrações eram conhecidas, foi plotada uma curva padrão em um gráfico de eixo Log-Log, no qual os valores de absorbâncias dos padrões e das amostras ficaram no eixo y, enquanto a concentração do analito ficou no eixo x. Dessa forma, sabendo-se a concentração e o respectivo valor de absorbância do padrão, foi determinada a equação da reta desse gráfico Log-Log. Em seguida,

utilizando os valores de absorbância da amostra e a equação da reta, a concentração de citocinas das amostras foi calculada. Esses últimos valores foram colocados no *GraphPad Prism 10.1.0* para análise estatística e elaboração dos gráficos.

Figura 14 - Fluxograma acerca do ensaio de avaliação dos níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α .



Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canvas (2025).

4.1.9 Avaliação da tumescência mitocondrial

4.1.9.1.1 Procedimento Experimental - Isolamento mitocondrial

Antes de começar o ensaio, os reagentes foram preparados, sendo eles Tampão Isolamento, Tampão Experimento, Succinato, CaCl₂ e Oligomicina. Os tampões foram preparados respeitando o limite de 10 dias para uso, BSA foi adicionado aos tampões no dia de realizar o isolamento mitocondrial e a leitura no espectrofotômetro. O pH do tampão foi ajustado para 7,2 somente depois de adicionar BSA, considerando temperatura de 25°C (Tabelas 1,2 e 3) (Araújo et al., 2022; Tahara; Navarete; Kowaltowski, 2009).

Tabela 1 - Composição do Tampão Isolamento, para pH 7,2.

Reagente	50 mL (Água Destilada)
Sacarose	2,139 g
Manitol	2,277 g
HEPES	0,119 g
EGTA	0,19 g
BSA	50 mg

Legenda: Composição do Tampão Isolamento no ensaio de *swelling* mitocondrial. Apresenta-se a quantidade, em gramas, de cada reagente para ser dissolvido em 50 mL de água destilada. O pH do tampão foi ajustado para 7,2, após a adição de BSA, somente no dia que foi utilizado para a execução do ensaio (Araújo et al., 2022; Tahara; Navarete; Kowaltowski, 2009).

Tabela 2 - Composição do Tampão Experimento, para pH 7,2.

Reagente	50 mL (Água destilada)
Sacarose	0,4275 g
Manitol	0,683 g
Kh ₂ PO ₄	0,034 g
TRIS-HCl	0,121 g
KCl	0,3728 g
BSA	50 mg

Legenda: Composição do Tampão Experimento utilizado no ensaio de *swelling* mitocondrial. Apresenta-se a quantidade, em gramas, de cada reagente para ser dissolvido em 50 mL de água destilada. O pH do tampão foi ajustado para 7,2, após a adição de BSA, somente no dia que foi utilizado para a execução do ensaio (Araújo et al., 2022; Tahara; Navarete; Kowaltowski, 2009).

Tabela 3 - Composição dos reagentes para a leitura das mitocôndrias

Reagente	Quantidade de soluto	pH
Succinato	236 mg/mL, (Água destilada)	7
Oligomicina	1 mg/mL (DMSO)	-
CaCl ₂	0,033294 mg/mL (Água destilada)	-

Legenda: Reagentes utilizados para o ensaio de *swelling* mitocondrial. Apresenta-se a quantidade, em gramas, de cada reagente por mL de seu respectivo solvente. O pH da solução de Succinato foi ajustado para 7,0, após o seu preparo (Araújo et al., 2022; Tahara; Navarete; Kowaltowski, 2009).

Foram isoladas as mitocôndrias de células PC12 e Astrócitos, após processo de Plaqueamento, exposição a LPS e a Colchicina. Para isso, foi separado um microtubo de centrifugação (Eppendorf®) para cada poço da placa utilizado no experimento. Cada poço teve o seu meio de cultura removido e seu fundo lavado 3x com PBS não-estéril. Em cada etapa dessa, o conteúdo era transferido para o respectivo microtubo. Em seguida, era adicionado de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco®) 1X, incubando-se por 5 minutos a 37 °C e inativando-se com o meio de cultura do próprio poço coletado anteriormente, devolvendo-se o material ao microtubo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 2800 rpm, 25 °C por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspensionado em 300 µL de PBS não estéril, para serem realizadas mais 3x centrifugações (2800 rpm, 25 °C, 5 minutos), sempre descartando o sobrenadante e ressuspensionado o *pellet* de células em 300 µL de PBS não estéril.

Na última centrifugação, o sobrenadante foi descartado, retirando cuidadosamente, com auxílio de papel toalha, o PBS não estéril remanescente no microtubo. Logo depois, foi adicionado 100 µL do Tampão Isolamento, sempre mantido dentro de isopor com gelo, e 1 µL da solução de Digitonina ao *pellet* de células. Após receberem Tampão Isolamento, todas as amostras ficam sob gelo. Depois, foi feita uma centrifugação (4 °C, 9400 RCF, 10 minutos) para isolamento da mitocôndria. Ao término, o sobrenadante foi descartado, secando cuidadosamente o resquício de líquido no microtubo com papel toalha, adicionando-se novamente 100 µL de Tampão Isolamento as amostras, para preservá-las, mantendo-se sob gelo.

4.1.9.1.2 *Análise da tumescência mitocondrial (Swelling mitochondrial)*

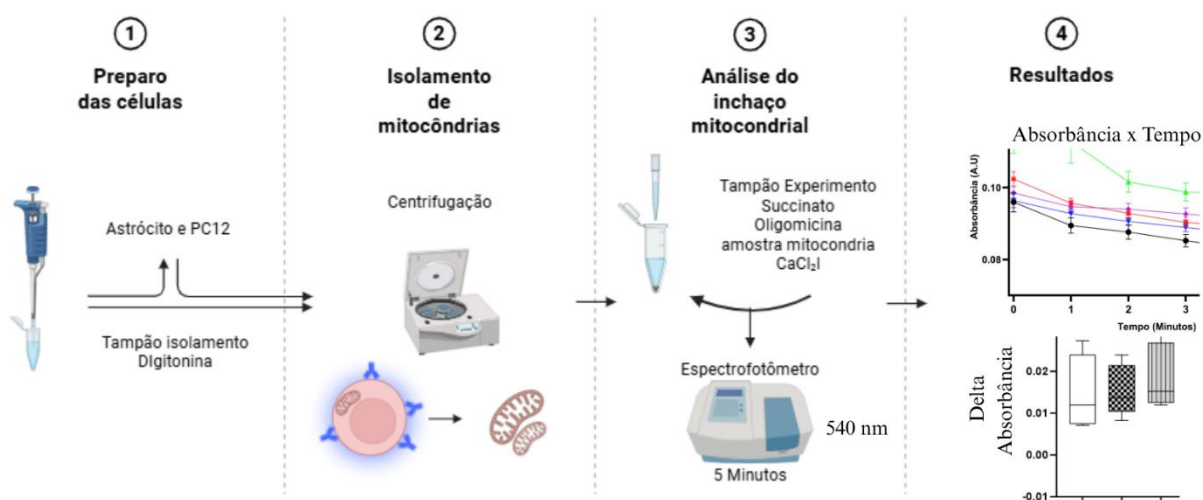
A leitura foi realizada no espectrofotômetro (*Genesys 10s UV-Vis*, ThermoSCIENTIFIC®). Foi colocado na cubeta 1 mL de Tampão Experimento, mantido a temperatura ambiente para simular o ambiente corporal. Em seguida, nesta ordem, foi colocado 20 µL de Succinato, 1 µL de Oligomicina e 30 µL da amostra mitocondrial. A leitura dos valores de absorbância era feita durante 5 minutos, para cada amostra pipetada. Salienta-se que após o primeiro valor de absorbância obtido após iniciar a leitura, era adicionado 6 µL de CaCl₂, para induzir a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial. Com o término da corrida de 5 minutos, a cubeta era lavada com água destilada, depois era adicionado novamente os reagentes com uma nova amostra para leitura (Figura 15) (Chapa-Dubocq et al., 2018; Lemasters et al., 2009).

4.1.9.1.3 Análise dos dados

Com os valores de absorbância obtidos, foi calculado a variação da absorbância, em que para cada amostra lida, utilizava-se o valor de absorbância inicial – valor de absorbância final (ΔA). Esses valores finais foram utilizados para análise estatística. Além do mais, foi plotado um gráfico com os valores de absorbância em função do tempo.

Figura 15 - Fluxograma do ensaio de avaliação da tumescência mitocondrial em mitocôndrias isoladas de astrócitos e células PC12.

Avaliação da tumescência mitocondrial



Fonte: Criado pelo próprio autor por meio do Biorender e Canvas (2025).

4.1.10 Análise estatística

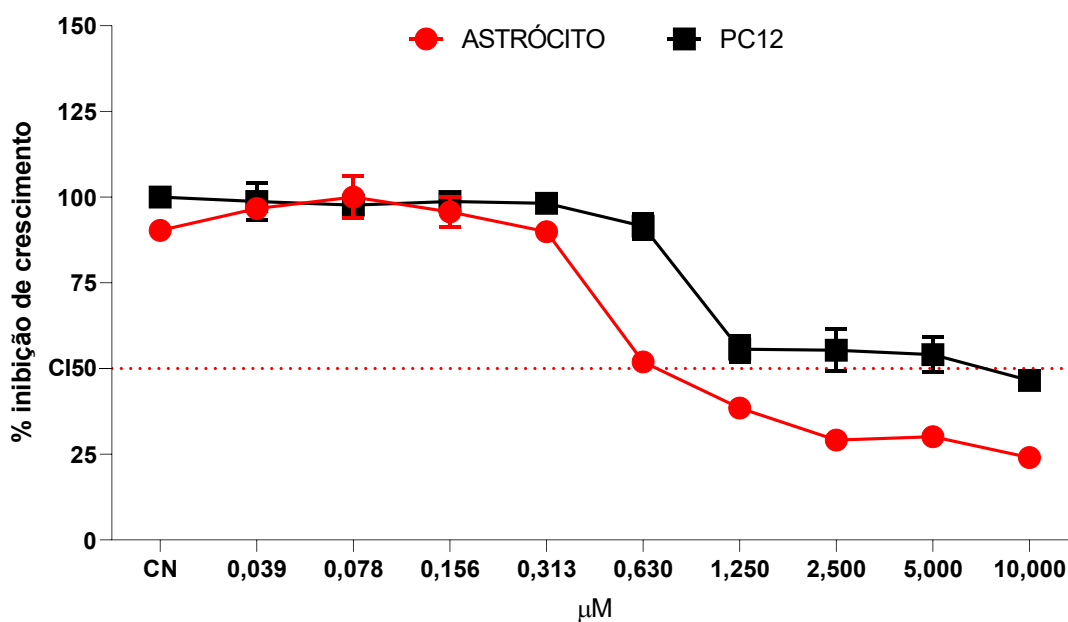
Foi empregado o *GraphPad Prism 10.1.0*. Os dados considerados paramétricos, após o teste de normalidade, foram analisados por *One-Way ANOVA* ou por *Two-Way ANOVA*, ao passo que, os dados considerados não paramétricos, foram analisados por *Kruska-Wallis*, seguidos de testes *post hoc*. Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$. Nas ilustrações, são apresentados os valores de p das comparações que possuíram significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da viabilidade celular

A partir do teste de viabilidade celular com o ensaio do MTT, revelou que a colchicina apresenta efeitos citotóxicos dependentes da concentração tanto em astrócitos quanto na linhagem PC12. Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) foram de 1,196 μM (Astrócito) e 5,592 μM (PC12) (Figura 16 e Tabela 4). Os astrócitos apresentaram-se mais sensíveis à colchicina do que as células PC12, visto que apresentam uma IC_{50} aproximadamente cinco vezes menor.

Figura 16 - Perfil citotóxico da Colchicina para as linhagens celulares Astrócitos e PC12 determinado pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação na concentração inicial de 10 μM , sem tratamento prévio com LPS.



Perfil citotóxico da Colchicina Perfil citotóxico da Colchicina para as linhagens celulares Astrócitos e PC12 determinado pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação. Vermelho: (%) Inibição de crescimento para os astrócitos; Preto: (%) Inibição de crescimento para as células PC12. CI_{50} está representada por tracejado horizontal.

Tabela 4 - Valores de CI₅₀ da Colchicina para as células Astrócito e PC12, obtidos a partir do MTT após 24h de incubação com colchicina, sem tratamento prévio com LPS.

Substância	CI ₅₀ (μM)	
	Intervalo de Confiança de 95%	
	Astrócito	PC12
Colchicina	1,196 (0,8961-1,633)	5,592 (4,111-8,207)

Valores de CI₅₀ (μM) calculados a partir de regressão não linear. O intervalo de confiança de 95% (IC 95%), que está representado entre parêntesis, foi obtido a partir de 2 experimentos independentes, cada qual em triplicata. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O ensaio de MTT foi fundamental para definir concentrações de colchicina que não comprometessem a viabilidade celular de forma significativa, sendo, portanto, seguras para os experimentos subsequentes. Assim, foram escolhidas as concentrações 0,312 μM (Col₁), 0,156 μM (Col₂) e 0,07815 μM (Col₃), para ambas as linhagens celulares (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentrações selecionadas de colchicina para Astrócito e PC12, com seus respectivos valores de viabilidade celular, obtidos com ensaio do MTT após 24h de incubação, sem tratamento prévio com LPS.

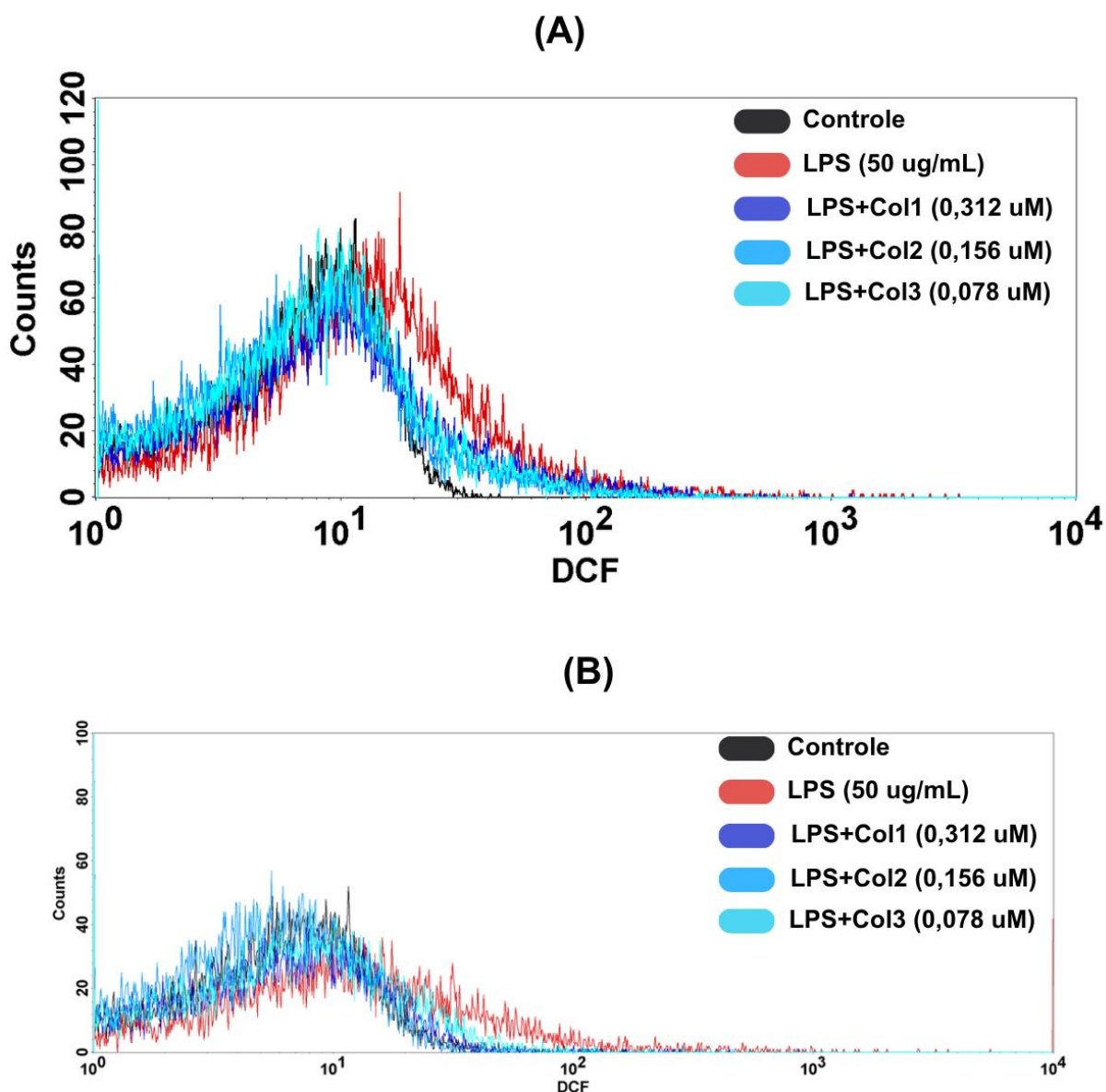
Substância	Concentração (μM)		Viabilidade Celular (%) (Média ±SEM)	
	Astrócito	PC12	Astrócito	PC12
Colchicina	0,312	0,312	89,940 ±2,930	98,225 ±1,324
	0,156	0,156	95,734 ±7,627	98,715 ±2,852
	0,07815	0,07815	100,00 ±10,638	97,674 ±1,272

Concentrações escolhidas de colchicina para Astrócito e PC12, com seus respectivos valores de viabilidade celular, obtidos com ensaio do MTT após 24h de incubação. Valores normalizados em relação ao grupo controle.

5.2 Avaliação do Estresse Oxidativo por marcação citoplasmático com DCFH-DA

Pode-se observar que o tratamento com LPS promoveu um deslocamento do pico de fluorescência para a direita, indicando aumento da produção ROS em ambas as linhagens celulares (Figura 17). Os tratamentos com colchicina nas diferentes concentrações resultaram em um deslocamento do pico em direção à esquerda, revertendo o aumento da fluorescência provocado pelo LPS e, conseqüentemente, reduzindo os níveis de EROS intracelular. Este efeito foi mais evidente nas células PC12, principalmente nas concentrações Col₂ e Col₃, quando comparado aos astrócitos.

Figura 17 - Histograma representativo da análise do estresse oxidativo citossólico, realizado por citometria de fluxo utilizando o marcador DCFH-DA, em astrócitos (A) e células PC12 (B) após 24 horas de exposição ao LPS e tratamento com colchicina.



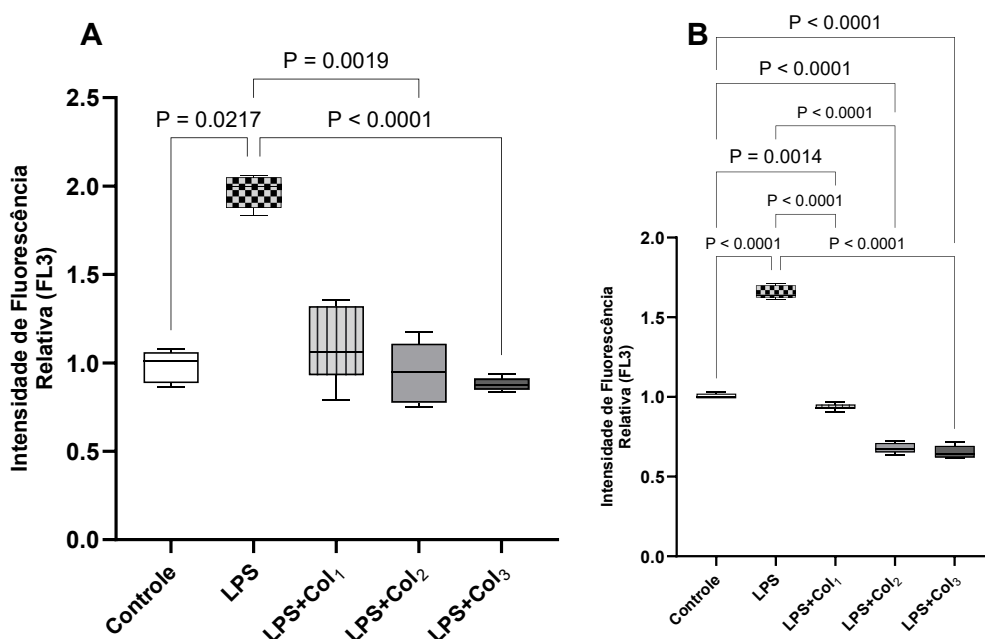
Avaliação do Estresse Oxidativo intracelular por marcação com DCFH-DA após exposição à LPS e à Colchicina. Controle está representado de preto, LPS de vermelho e as diferentes concentrações de colchicina estão com as tonalidades de azul. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$. Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM . Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo.

Nos astrócitos (Figura 18A), observou-se que o tratamento com LPS promoveu um aumento significativo dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) em comparação ao controle ($P=0.0310$), indicando elevado estresse oxidativo intracelular. Por outro lado, os tratamentos com colchicina nas concentrações Col₂ e Col₃ foram eficazes em reverter esse aumento, restaurando os níveis de ROS para valores semelhantes aos do controle. Os valores

observados foram: Controle: $0,9900 \pm 0,03718$; LPS: $1,972 \pm 0,06642$; LPS+Col₂: $0,9482 \pm 0,05592$; LPS+Col₃: $0,8801 \pm 0,01104$).

De forma semelhante, nas células PC12 (Figuras 18B), a exposição ao LPS também resultou em aumento expressivo do estresse oxidativo, quando comparado ao controle ($P < 0.0001$). Todas as concentrações de colchicina utilizadas (Col₁, Col₂ e Col₃) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de ROS induzidos pelo LPS ($P < 0.0001$), sendo que as menores concentrações (Col₂ e Col₃) promoveram uma redução mais acentuada, diferindo estatisticamente do controle. Os valores registrados foram: Controle: $1,005 \pm 0,006496$; LPS: $1,654 \pm 0,01617$; LPS+Col₁: $0,9367 \pm 0,006825$; LPS+Col₂: $0,6795 \pm 0,01$; LPS+Col₃: $0,6541 \pm 0,01782$).

Figura 18 - Níveis de Estresse Oxidativo citoplasmático em Astrócitos (A) e PC12 (B) após exposição à LPS e tratamento com colchicina.

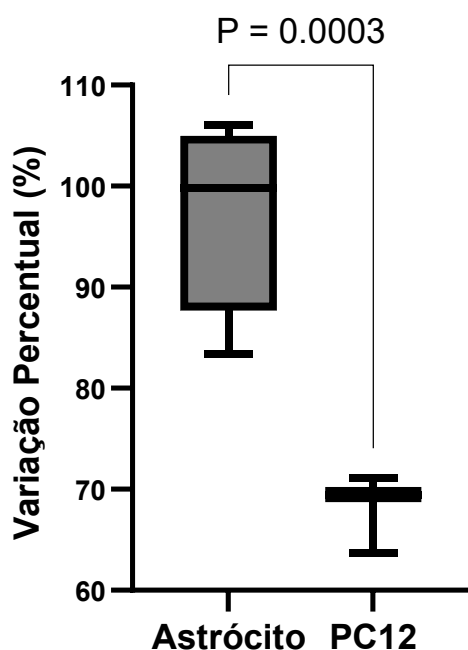


Avaliação de Estresse Oxidativo por marcação com DCFH-DA após exposição a LPS e tratamento com colchicina (24h) para (A) Astrócitos e (B) PC12. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado (A) *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn* e (B) ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. A imagem apresenta somente as comparações com significância estatística (A) $n = 6-10$; (B) $n = 5-10$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM . Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo.

Além disso, ao se comparar o percentual de aumento da fluorescência do DCFH-DA, indicativo de ativação do estresse oxidativo, entre astrócitos e células PC12 expostas ao LPS

por 24 horas (Figura 19), verificou-se que os astrócitos apresentaram uma resposta mais intensa. O percentual médio de ativação foi de $97,16 \pm 3,72\%$ nos astrócitos, contra $68,09 \pm 2,25\%$ nas células PC12 ($P=0.0003$), sugerindo-se que os astrócitos são mais suscetíveis ao aumento de EROS sob estímulo inflamatório induzido por LPS.

Figura 19 - Comparação do grau de ativação (%) entre Astrócito e células PC12 no ensaio de Estresse Oxidativo por marcação com DCFH-DA.



Comparação do grau de ativação (%) no ensaio de Estresse Oxidativo por marcação com DCFH-DA após exposição a LPS (24h) e a Colchicina (24h). Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, *Unpaired t test*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. A imagem apresenta somente as comparações com significância estatística. Astrócito $n = 6$; PC12 $n = 3$. LPS. Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo.

5.3 Produção dos níveis de Nitrito/Nitrato (NO_2^-) em meio condicionado

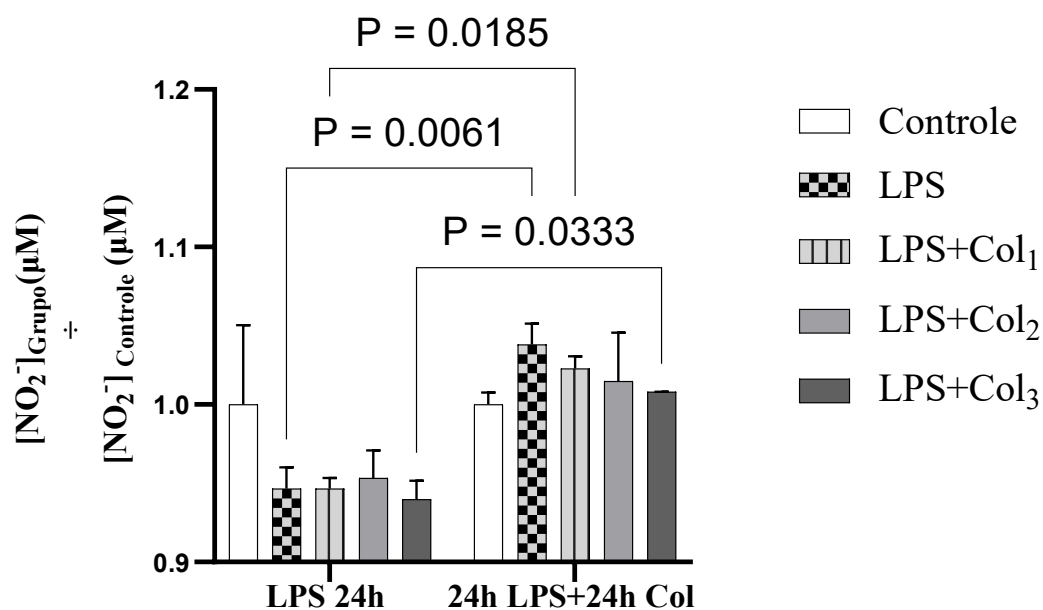
5.3.1 Astrócitos

Na avaliação realizada após 24 horas de exposição ao LPS, antes do tratamento com colchicina (LPS 24h, Figura 20), observou-se que todos os grupos expostos ao LPS apresentaram uma redução dos níveis de NO_2^- em relação ao controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Além disso, os grupos LPS e LPS+Col (Col_1 , Col_2 e Col_3) mostraram níveis semelhantes entre si. Os valores foram: Controle: $1,000 \pm 0,05033$; LPS: $0,9467 \pm 0,01333$; LPS+ Col_1 : $0,9467 \pm 0,006667$; LPS+ Col_2 : $0,9533 \pm 0,01764$; LPS+ Col_3 : $0,9400 \pm 0,01155$.

Na análise realizada após 24 horas de tratamento com colchicina — tratamento feito depois das 24h de LPS (24h LPS+24h Col, Figura 20); o grupo exposto ao LPS apresentou um aumento dos níveis de NO_2^- em relação ao controle, porém, sem significância estatística. Os grupos tratados com colchicina (LPS+ Col_1 , LPS+ Col_2 e LPS+ Col_3) mostraram redução nos níveis de NO_2^- quando comparados ao grupo LPS, porém, novamente, sem diferença estatística. Os valores foram: Controle: $1 \pm 0,007634$; LPS: $1,038 \pm 0,01527$; LPS+ Col_1 : $1,023 \pm 0,007633$; LPS+ Col_2 : $1,015 \pm 0,03053$; LPS+ Col_3 : $1,008 \pm 1,367\text{e-}007$.

Quando se compara (LPS 24h) x (24h LPS+24h Col) (Figura 20), observa-se que o grupo LPS (24h LPS+24h Col) apresentou aumento significativo nos níveis de NO_2^- em comparação ao mesmo grupo no LPS 24h ($P=0,0061$). Esse fato também ocorreu para os grupos LPS+ Col_1 ($P=0,0185$) e LPS+ Col_3 e ($P=0,0333$), em (24h LPS+24h Col). Nesse caso, os níveis de NO_2^- aumentaram de forma estatisticamente significativa em relação aos mesmos grupos no (LPS 24h). Os valores foram: (LPS 24h) — LPS: $0,9467 \pm 0,01333$; LPS+ Col_1 : $0,9467 \pm 0,006667$; LPS+ Col_3 : $0,9400 \pm 0,01155$; (LPS+24h Col) — LPS: $1,038 \pm 0,01527$; LPS+ Col_1 : $1,023 \pm 0,007633$; LPS+ Col_3 : $1,008 \pm 1,367\text{e-}007$.

Figura 20 - Níveis de (NO_2^-) de Astrócitos após LPS somente e LPS+Colchicina em meio condicionado.



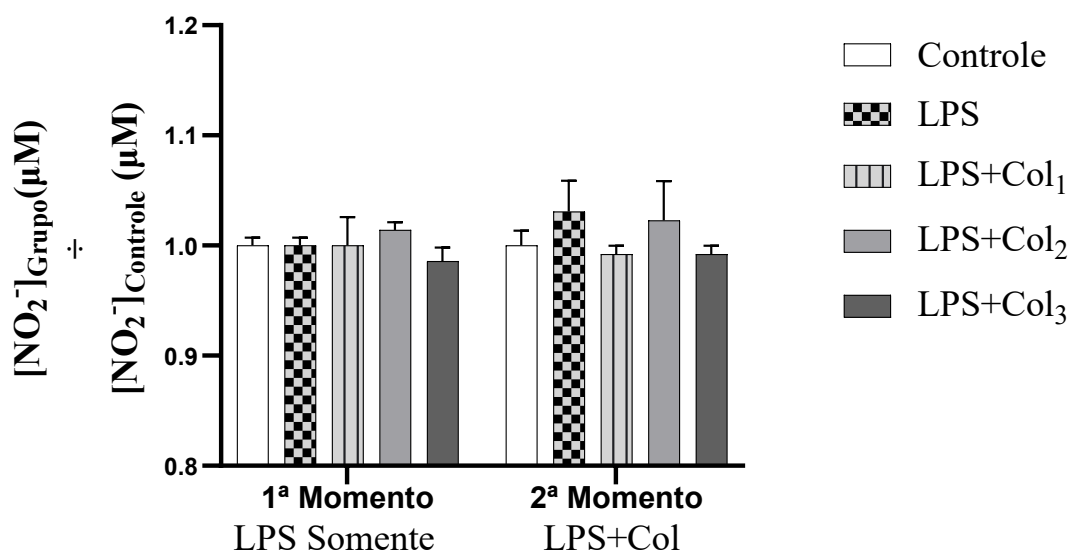
Avaliação de Níveis de (NO₂⁻) de Astrócitos após LPS somente (A) e LPS+Colchicina (B) em meio condicionado. Os resultados estão apresentados como Média ± SEM. Para análise estatística, foi usado Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 μg/mL; Col1: 0,312 μM; Col2 0,156 μM; Col3: 0,07815 μM.

5.3.2 PC12 (*Feocromocitoma*)

Em uma segunda etapa da análise (LPS 24h, Figura 21), realizada também após a exposição ao LPS, antes do tratamento com colchicina, observou-se que todos os grupos tratados com LPS apresentaram níveis de NO₂⁻ semelhantes entre si e ao controle, com exceção do grupo LPS+Col₂, que apresentou um leve aumento, ainda assim sem alcançar significância estatística. Os valores foram: Controle: $1 \pm 0,007143$; LPS: $1 \pm 0,007143$; LPS+Col₁: $1 \pm 0,02575$; LPS+Col₂: $1,014 \pm 0,007143$; LPS+Col₃: $0,9857 \pm 0,01237$).

Após o tratamento com colchicina (24h LPS+24h Col, Figura 21), os grupos LPS e LPS+Col₂ apresentaram valores ligeiramente elevados de NO₂⁻ em comparação ao controle, porém sem significância estatística. Por outro lado, os grupos LPS+Col₁ e LPS+Col₃ apresentaram níveis reduzidos, semelhantes ao controle, também sem diferença estatística. Os valores foram: Controle: $1 \pm 0,01343$; LPS+Col₁: $1,031 \pm 0,02795$; LPS+Col₂: $1,023 \pm 0,03552$; LPS+Col₃: $0,9922 \pm 0,007752$).

Figura 21 - Níveis de (NO_2^-) de células PC12 após LPS somente (A) e LPS+Colchicina (B) em meio condicionado.

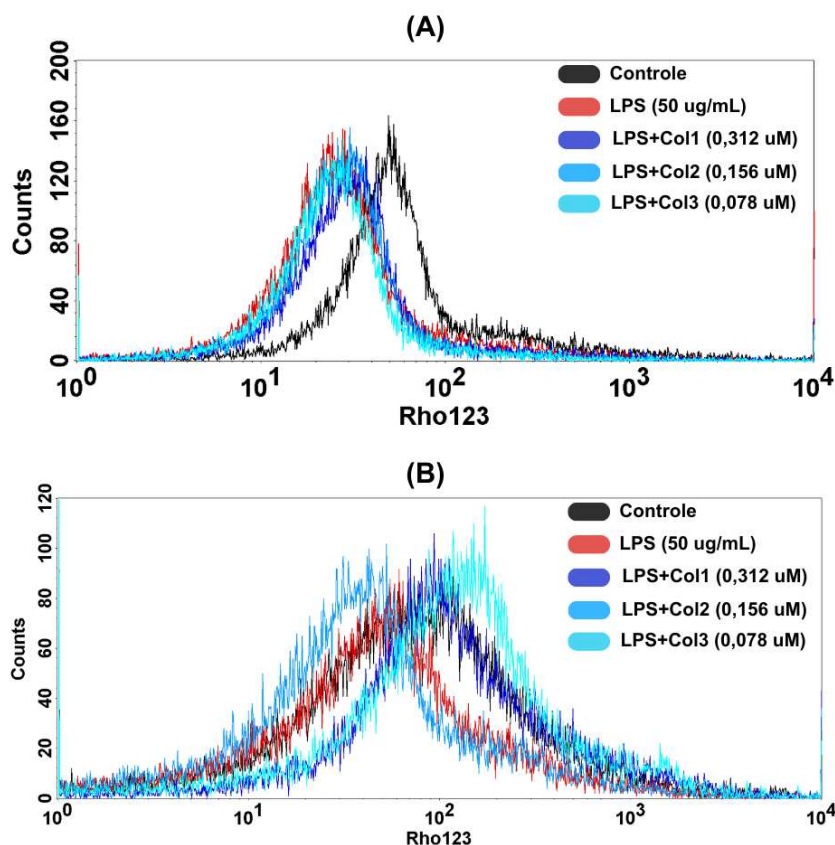


Avaliação de Níveis de (NO_2^-) de células PC12 após LPS somente (A) e LPS+Colchicina (B) em meio condicionado. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂: 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

5.4 Avaliação do potencial mitocondrial por meio da marcação com Rh123

Observou-se que, nos astrócitos (Figura 22A), o tratamento com LPS provocou um deslocamento do pico de fluorescência para a esquerda, indicando uma redução significativa do potencial mitocondrial, efeito que foi acentuado com as diferentes concentrações de colchicina. Em contraste, nas células PC12 (Figura 22B), embora o LPS também tenha causado uma diminuição do potencial mitocondrial, os tratamentos com colchicina promoveram um deslocamento do pico para a direita, indicando recuperação e aumento do potencial mitocondrial, especialmente nas concentrações Col₁ e Col₃.

Figura 22 - Histogramas representativos da análise do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em astrócitos (A) e células PC12 (B), obtidos por citometria de fluxo utilizando o marcador Rodamina 123 (Rh123), após 24 horas de exposição ao LPS e posterior tratamento com colchicina.



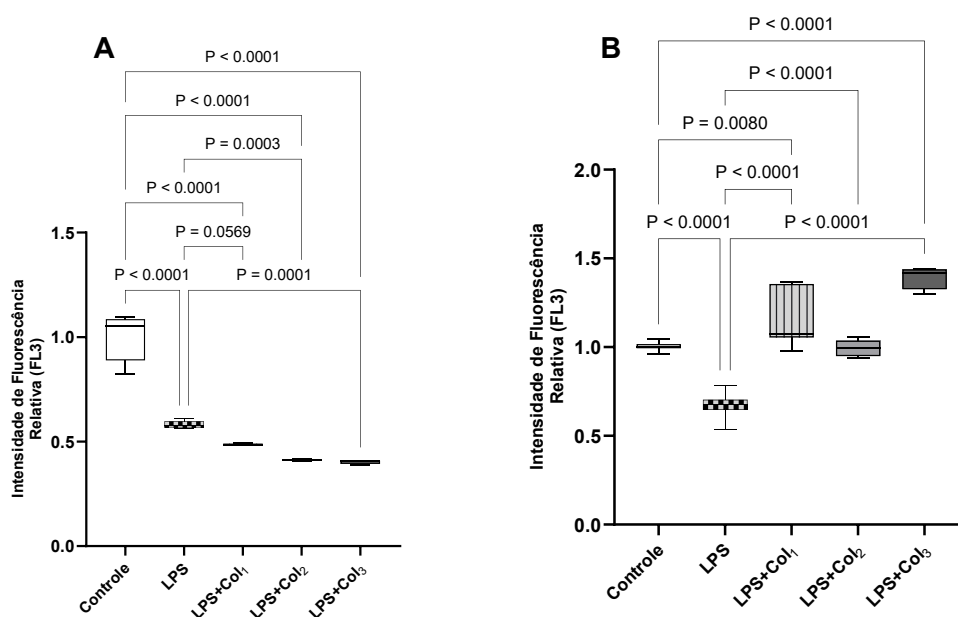
Avaliação do potencial transmembrana da mitocôndria após exposição ao LPS e tratamento com colchicina. Controle está representado de preto, LPS de vermelho e as diferentes concentrações de colchicina estão com as tonalidades de azul. Col₁: 0,312 μ M; Col₂ 0,156 μ M; Col₃: 0,07815 μ M. Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo.

Nos astrócitos (Figura 23A), a exposição ao LPS resultou em uma redução significativa do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em comparação ao grupo controle ($P < 0.0001$), evidenciando disfunção mitocondrial induzida pelo estímulo inflamatório. Notavelmente, o tratamento com colchicina, nas diferentes concentrações testadas (Col₁, Col₂ e Col₃), não foi capaz de reverter essa perda de $\Delta\Psi_m$. Pelo contrário, os grupos tratados com colchicina apresentaram uma queda ainda mais acentuada no potencial mitocondrial, tanto em relação ao controle ($P < 0.0001$ para as três concentrações de teste) quanto ao grupo LPS (Col₁: $P = 0.0569$, Col₂: $P = 0.0003$ e Col₃: $P < 0.0001$), indicando um possível efeito tóxico mitocondrial da colchicina em astrócitos. Os valores observados foram: Controle: $1,000 \pm 0,05049$; LPS: $0,5815 \pm 0,0076686$; LPS+Col₁: $0,4862 \pm 0,002024$; LPS+Col₂: $0,4114 \pm 0,01439$; LPS+Col₃: $0,4016 \pm 0,004063$).

Por outro lado, nas células PC12 (Figura 23B), o LPS também promoveu uma redução significativa do potencial mitocondrial em comparação ao controle ($P < 0.0001$), refletindo disfunção mitocondrial semelhante à observada nos astrócitos. No entanto, o comportamento

frente ao tratamento com colchicina foi distinto, no qual as concentrações LPS+Col₁ ($P < 0.0001$) e LPS+Col₃ ($P < 0.0001$) promoveram não apenas a reversão da perda de $\Delta\Psi_m$ induzida pelo LPS, como também um aumento significativo do potencial mitocondrial em relação ao controle ($P = 0.0114$ e $P < 0.0080$, respectivamente), sugerindo um efeito bioenergético benéfico nesses grupos. O grupo LPS+Col₂, apesar de apresentar melhora em relação ao LPS ($P < 0.0001$), não alcançou diferença significativa em relação ao controle, mantendo níveis semelhantes ao basal. Os valores registrados foram: Controle: $1,003 \pm 0,008319$; LPS: $0,6706 \pm 0,02813$; LPS+Col₁: $1,177 \pm 0,06531$; LPS+Col₂: $0,9941 \pm 0,01699$; LPS+Col₃: $1,394 \pm 0,03225$).

Figura 23 - Avaliação do potencial transmembrana da mitocôndria em Astrócitos (A) e PC12 (B) após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.

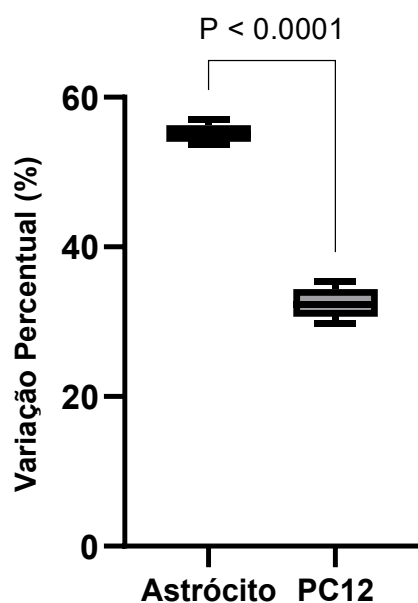


Avaliação do potencial transmembrana da mitocôndria após exposição ao LPS e tratamento com colchicina para (A) Astrócitos e (B) células PC12. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. A imagem apresenta somente as comparações com significância estatística. (A) $n = 5$; (B) $n = 4-8$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂: 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM . Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo.

Além disso, na análise comparativa do percentual de redução do potencial mitocondrial induzido pelo LPS (Figura 24), verificou-se que os astrócitos apresentaram uma perda mais

acentuada de $\Delta\Psi_m$ em comparação às células PC12, indicando uma maior suscetibilidade mitocondrial frente ao estímulo inflamatório. Os percentuais de redução foram de 55,15% ($\pm 0,562$) para os Astrócitos e 32,49% ($\pm 0,93$) para PC12.

Figura 24 - Comparação do grau de ativação (%) entre Astrócito e células PC12 no ensaio de potencial mitocondrial por marcação com *Rh123*.



Comparação do grau de ativação (%) no ensaio de potencial mitocondrial por marcação com *Rho123* após exposição ao LPS) e tratamento com colchicina. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado *Unpaired t test*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. A imagem apresenta somente as comparações com significância estatística. Astrócito $n = 5$; PC12 $n = 5$. LPS. Pelo menos 10 mil eventos foram analisados para esse experimento de citometria de fluxo

5.5 Avaliação dos níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α

5.5.1 Astrócito - Meio condicionado

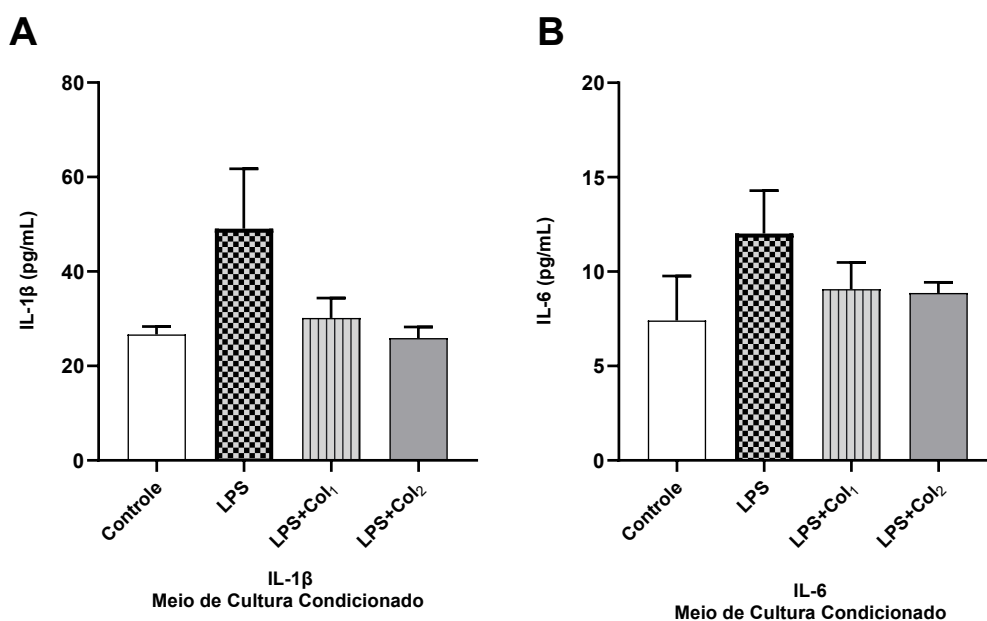
Na análise dos níveis de IL-1 β (Figura 25A), observou-se que o grupo tratado com LPS apresentou um aumento dos níveis da citocina em comparação ao controle, porém sem significância estatística. Os grupos tratados com colchicina (LPS+Col₁ e LPS+Col₂) apresentaram uma redução nos níveis de IL-1 β em relação ao grupo LPS, alcançando valores próximos ao controle, embora essa diferença também não tenha sido estatisticamente

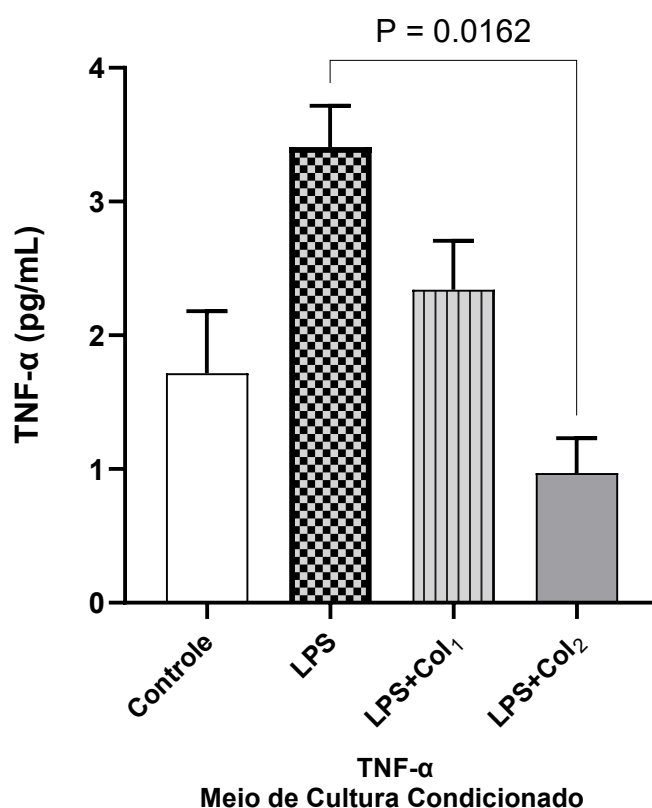
significativa. Os valores registrados foram: Controle: $26,67 \pm 1,676$; LPS: $49,06 \pm 12,68$; LPS+Col₁: $30,18 \pm 0,06531$; LPS+Col₂: $25,92 \pm 2,354$).

Quanto aos níveis de IL-6 (Figura 25B), o tratamento com LPS resultou em um aumento dos níveis dessa citocina em comparação ao controle, porém, novamente, sem significância estatística. Os grupos tratados com colchicina (LPS+Col₁ e LPS+Col₂) apresentaram uma redução nos níveis de IL-6 em relação ao LPS, retornando a níveis próximos ao do controle, porém sem diferenças estatísticas. Os valores observados foram: Controle: $7,409 \pm 2,359$; LPS: $12,02 \pm 2,268$; LPS+Col₁: $9,074 \pm 1,412$; LPS+Col₂: $8,874 \pm 0,5628$).

Para a TNF- α (Figura 25C), o grupo tratado com LPS apresentou um aumento nos níveis da citocina em relação ao controle, porém sem significância estatística. O grupo LPS+Col₁ promoveu uma redução dos níveis de TNF- α em relação ao LPS, porém sem alcançar significância estatística. Por outro lado, o grupo LPS+Col₂ foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α em relação ao grupo LPS ($P=0.0162$), indicando um efeito anti-inflamatório mais consistente nesta condição. Os dados foram: Controle: $1,716 \pm 0,4635$; LPS: $3,408 \pm 0,3655$; LPS+Col₁: $2,340 \pm 0,3655$; LPS+Col₂: $0,9707 \pm 0,2598$).

Figura 25 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo dos astrócitos.





Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo dos astrócitos. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

5.5.2 Astrócito – Homogenato celular

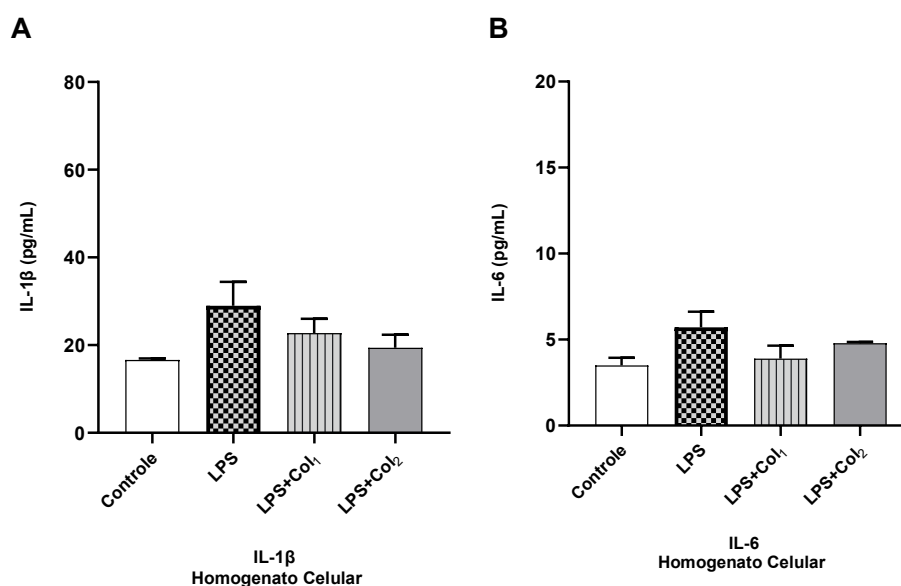
Nos níveis de IL-1 β (Figura 26A) avaliados no homogenato celular, o grupo LPS apresentou um aumento em comparação ao controle, porém sem significância estatística. Os grupos tratados com colchicina (LPS+Col₁ e LPS+Col₂) promoveram uma redução dos níveis de IL-1 β em relação ao LPS, embora ainda se mantivessem ligeiramente elevados quando comparados ao controle, mas sem diferença estatística. Os valores foram: Controle: 16,61 \pm 0,3534; LPS: 28,98 \pm 5,442; LPS+Col₁: 22,77 \pm 3,223; LPS+Col₂: 19,39 \pm 2,983).

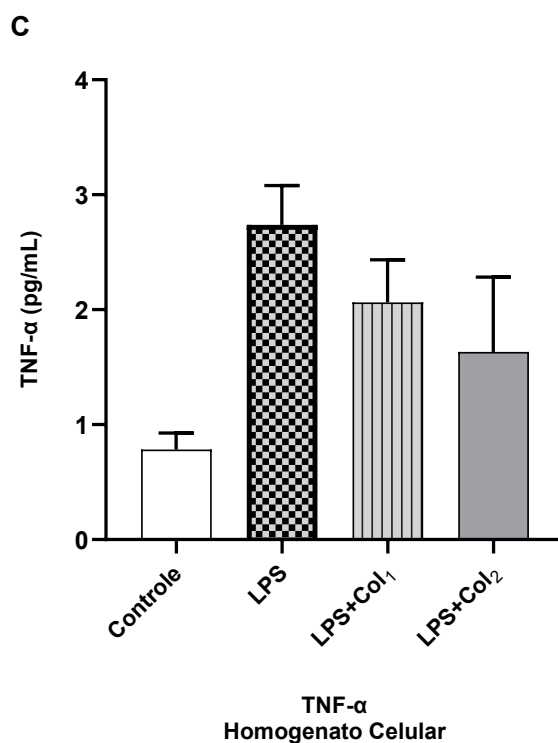
Para a IL-6 (Figura 26B), observou-se que o grupo LPS apresentou níveis aumentados em comparação ao controle, sem significância estatística. Os grupos LPS+Col₁ e LPS+Col₂ demonstraram redução dos níveis em relação ao LPS, sendo a maior redução observada no grupo LPS+Col₁. Contudo, ambos os grupos mantiveram níveis ligeiramente superiores ao controle, e nenhuma das comparações apresentou significância estatística. Os dados foram:

Controle: $3,502 \pm 0,4341$; LPS: $5,716 \pm 0,9088$; LPS+Col₁: $3,898 \pm 0,7519$; LPS+Col₂: $4,793 \pm 0,07119$).

Em relação ao TNF- α (Figura 26C), o grupo LPS apresentou um aumento nos níveis dessa citocina em relação ao controle, porém sem significância estatística. Os grupos tratados com colchicina (LPS+Col₁ e LPS+Col₂) demonstraram redução dos níveis de TNF- α em relação ao LPS, embora permaneçam acima dos valores do controle, sem diferença estatística. Os valores observados foram: Controle $0,7846 \pm 0,1435$; LPS: $2,738 \pm 0,3420$; LPS+Col₁: $2,063 \pm 0,3705$; LPS+Col₂: $1,632 \pm 0,6512$).

Figura 26 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo dos astrócitos.





Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo dos astrócitos. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂: 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

5.5.3 PC12 – Meio condicionado

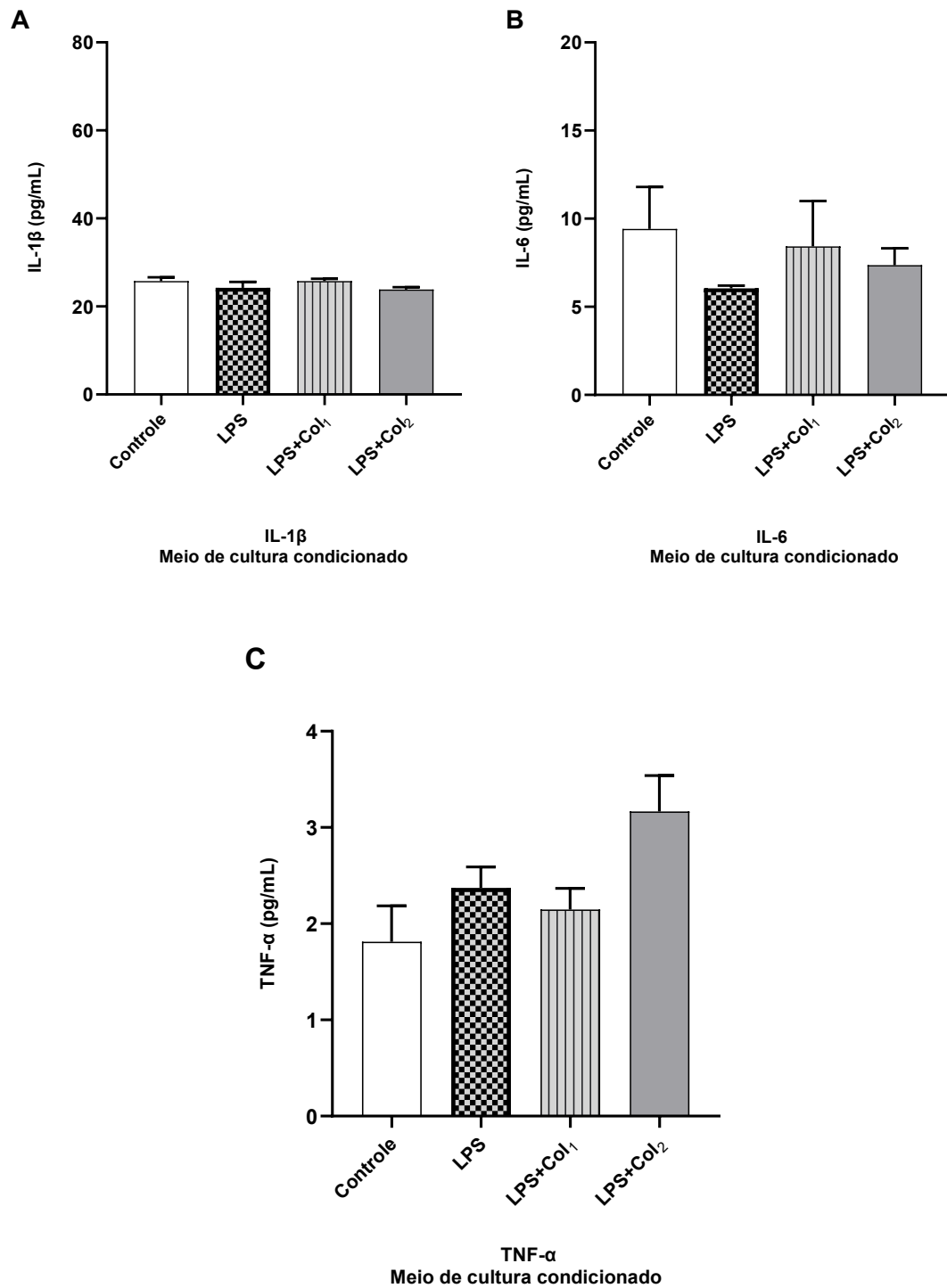
Na análise dos níveis de IL-1 β (Figura 27A), observou-se que todos os grupos apresentaram valores muito semelhantes entre si, não sendo detectada diferença estatística entre controle, LPS e os grupos tratados com colchicina. Os valores foram: Controle: $25,78 \pm 0,8560$; LPS: $24,22 \pm 1,364$; LPS+Col₁: $25,78 \pm 0,5316$; LPS+Col₂: $23,84 \pm 0,5487$.

Para a IL-6 (Figura 27B), os grupos controle, LPS e LPS+Col₁ apresentaram níveis semelhantes, sem diferença estatística. No entanto, o grupo LPS+Col₂ exibiu um aumento acentuado nos níveis de IL-6 em comparação aos demais grupos, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística, possivelmente devido à grande variação dos dados. Os valores registrados foram: Controle: $9,418 \pm 2,385$; LPS: $6,044 \pm 0,1590$; LPS+Col₁: $8,425 \pm 2,576$; LPS+Col₂: $47,04 \pm 39,68$.

Em relação ao TNF- α (Figura 27C), os grupos Controle, LPS e LPS+Col₁ apresentaram níveis semelhantes, sem diferença estatística. Por outro lado, o grupo LPS+Col₂ mostrou um aumento nos níveis de TNF- α , em comparação aos demais grupos, mas sem significância

estatística. Os valores observados foram: Controle: $1,812 \pm 0,3739$; LPS: $2,373 \pm 0,2162$; LPS+Col₁: $2,146 \pm 0,2205$; LPS+Col₂: $3,167 \pm 0,3732$.

Figura 27 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo de células PC12.



Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em meio condicionado oriundo de células PC12. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

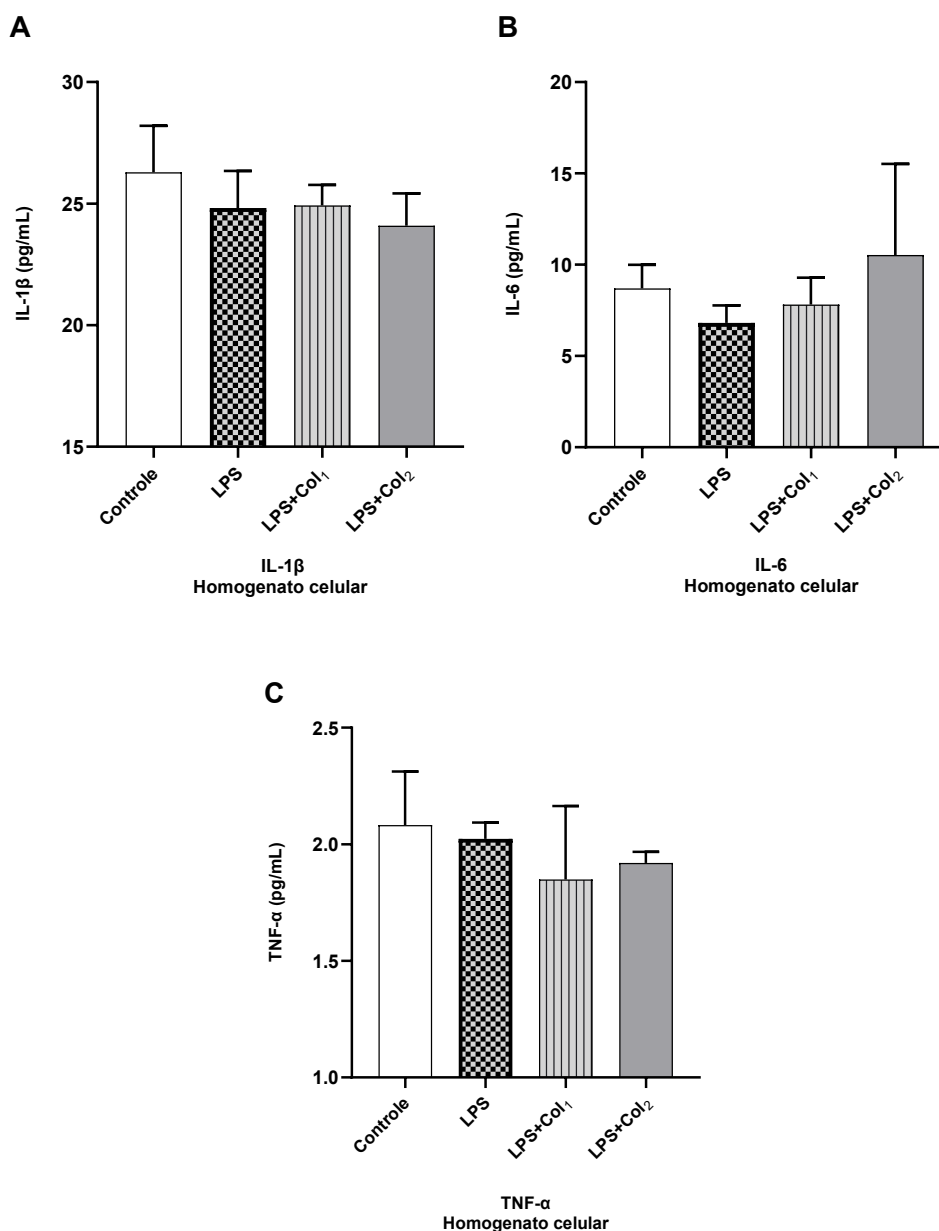
5.5.4 PC12 – Homogenato celular

Na avaliação dos níveis de IL-1 β (Figura 28A) no homogenato celular, os grupos LPS, LPS+Col₁ e LPS+Col₂ apresentaram uma leve redução nos níveis da citocina em comparação ao controle, porém, sem diferença estatística. Além disso, os três grupos tratados foram semelhantes entre si. Os dados foram: Controle: $26,29 \pm 1,912$; LPS: $24,82 \pm 1,524$; LPS+Col₁: $24,93 \pm 0,8387$; LPS+Col₂: $24,09 \pm 1,329$.

Para a IL-6 (Figura 28B), o grupo LPS apresentou uma leve redução nos níveis em comparação ao controle, enquanto o grupo LPS+Col₁ promoveu um discreto aumento em relação ao LPS, porém sem diferença estatística. O grupo LPS+Col₂ apresentou os maiores valores de IL-6, em relação aos demais grupos, embora sem alcançar significância estatística, possivelmente devido à alta dispersão dos dados. Os valores registrados foram: Controle: $8,699 \pm 1,293$; LPS: $6,810 \pm 0,9639$; LPS+Col₁: $7,815 \pm 1,479$; LPS+Col₂: $10,53 \pm 4,990$.

Em relação ao TNF- α (Figura 28C), os grupos Controle e LPS apresentaram valores muito semelhantes, enquanto os grupos LPS+Col₁ e LPS+Col₂ mostraram uma discreta redução dos níveis, sendo a maior redução observada no grupo LPS+Col₁. Entretanto, nenhuma das comparações apresentou significância estatística. Os valores foram: Controle: $2,082 \pm 0,2304$; LPS: $2,024 \pm 0,06958$; LPS+Col₁: $1,849 \pm 0,3156$; LPS+Col₂: $1,920 \pm 0,04767$.

Figura 28 - Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo de células PC12.



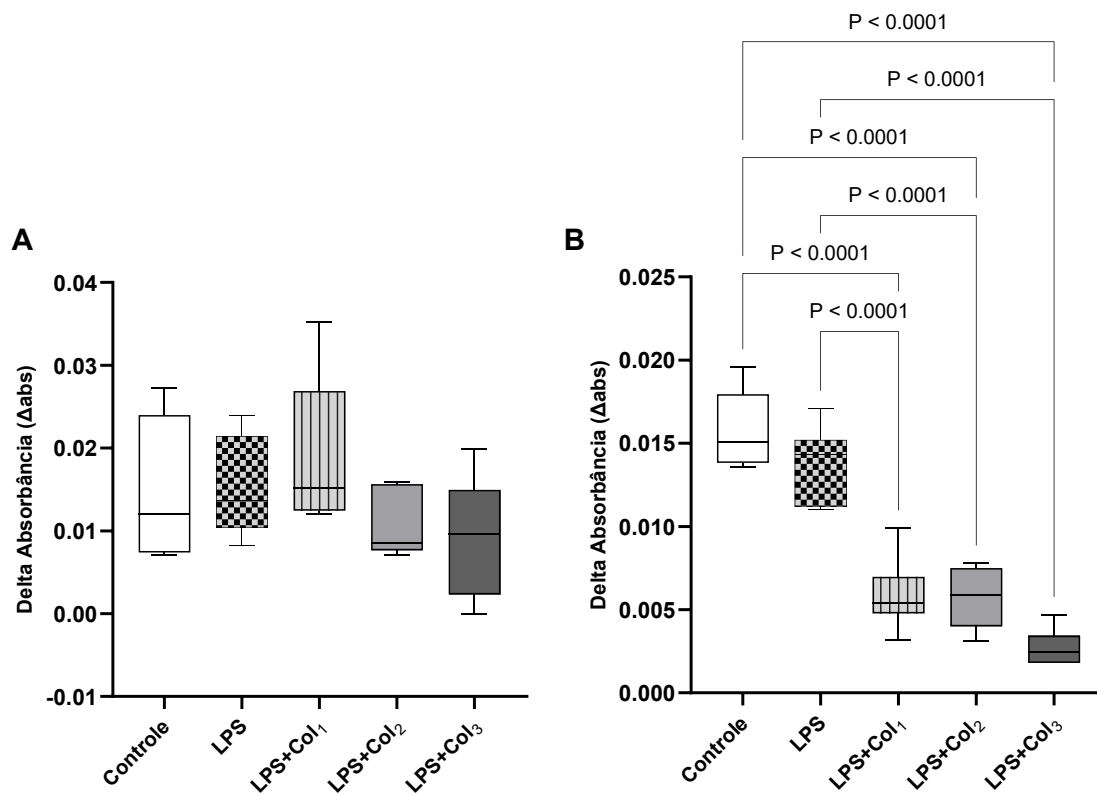
Níveis de citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) em homogenato celular oriundo de células PC12. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado ANOVA seguido do teste de *Sidak*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. O ensaio foi feito em uma única triplicata $n = 3$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

5.6 Avaliação da tumescência mitocondrial (*Swelling* mitocondrial)

Na análise dos astrócitos (Figuras 29A e 30A), observou-se que os valores de delta absorbância (ΔA) foram muito semelhantes entre os grupos Controle e LPS, sem diferença estatística. O grupo LPS+Col₁ apresentou um leve aumento de ΔA em relação ao Controle e ao LPS, sugerindo, teoricamente, maior tumescência mitocondrial, embora sem significância estatística. Por outro lado, os grupos LPS+Col₂ e LPS+Col₃ exibiram uma redução nos valores de ΔA , indicando menor tumescência mitocondrial, sendo a maior redução observada no grupo LPS+Col₃, porém sem diferença estatística. Os valores foram: Controle: $0,01496 \pm 0,003927$; LPS: $0,01548 \pm 0,002710$; LPS+Col₁: $0,01878 \pm 0,004260$; LPS+Col₂: $0,1104 \pm 0,001900$; LPS+Col₃: $0,008840 \pm 0,003320$).

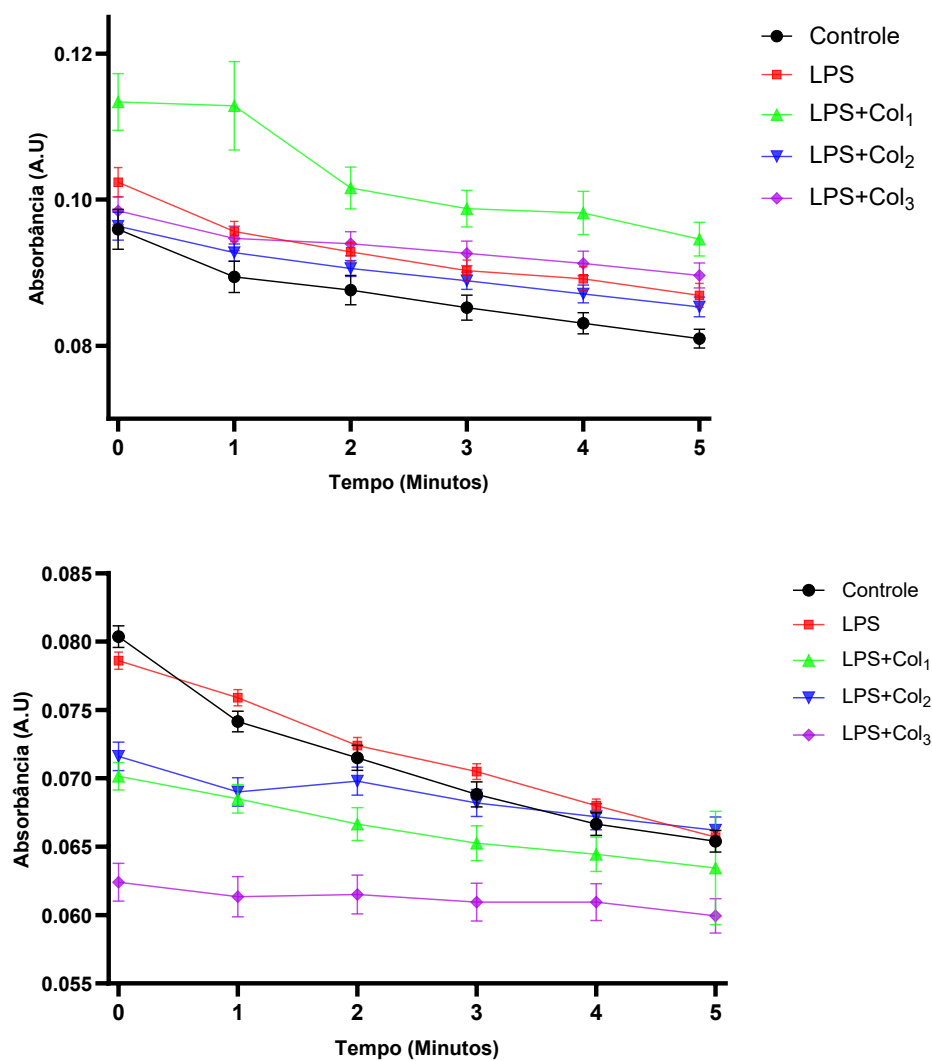
Para as células PC12 (Figuras 29B e 30B), o grupo LPS apresentou uma redução discreta nos valores de ΔA em relação ao Controle, sem diferença estatística. Entretanto, os grupos tratados com colchicina (LPS+Col₁, LPS+Col₂ e LPS+Col₃) mostraram reduções estatisticamente significativas nos valores de ΔA , quando comparados tanto ao grupo Controle ($P < 0.0001$) quanto ao LPS ($P < 0.0001$). A sequência das maiores para as menores reduções foi: LPS+Col₃, seguido de LPS+Col₂ e, por fim, LPS+Col₁. Isso sugere que, nas células PC12, a colchicina promoveu tumescência mitocondrial mais intenso e de maneira inversamente proporcional à concentração. Os dados foram: Controle: $0,01578 \pm 0,0009418$; LPS: $0,1397 \pm 0,0008337$; LPS+Col₁: $0,005867$; LPS+Col₂: $0,005571 \pm 0,0006603$; LPS+Col₃: $0,002700 \pm 0,0004502$).

Figura 29 - Delta absorbância (ΔA) para astrócito (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.



Delta absorbância (ΔA) para astrócito (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM. Para análise estatística, foi usado ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. Significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$. Astrócito $n=5$; PC12 $n=6-7$. LPS: Lipopolissacarídeo a 50 $\mu\text{g/mL}$; Col₁: 0,312 μM ; Col₂ 0,156 μM ; Col₃: 0,07815 μM .

Figura 30 - Valores de absorbância ao longo do tempo (5 minutos) para astrócitos (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina.



Valores de absorbância ao longo do tempo (5 minutos) para astrócitos (A) e células PC12 (B) no ensaio de tumescência mitocondrial após exposição ao LPS e tratamento com colchicina. Os resultados estão apresentados como Média \pm SEM.

6 DISCUSSÃO

O fator de transcrição Nrf2 é reconhecido como o principal regulador da resposta ao estresse oxidativo, além de desempenhar funções cruciais na modulação da inflamação, na manutenção da função mitocondrial, na autofagia e na apoptose (Qu et al., 2020; Zhang; Feng; Jiang, 2021; Zuo et al., 2022). A disfunção dessa via tem sido associada ao desenvolvimento de diversas condições patológicas, incluindo transtornos psiquiátricos (Hashimoto, 2018; Zgorzynska; Dziedzic; Walczewska, 2021). Dados clínicos reforçam essa associação, Sani et al., (2023) relataram uma redução dos níveis de Nrf2 correlacionada ao agravamento dos sintomas depressivos, e Hashemi et al., (2021) observaram uma *downregulation* significativa do Nrf2 em pacientes com depressão e transtorno bipolar. De forma complementar, Süzen et al., (2022) destacam que a ativação do Nrf2 é uma estratégia promissora na mitigação de processos neurodegenerativos.

Nesse contexto, a colchicina surge como um composto de interesse, dado seu potencial de ativação indireta da via do Nrf2. Seu mecanismo envolve a ligação à tubulina e inibição da polimerização dos microtúbulos, resultando na degradação de Keap1, regulador negativo do Nrf2, por meio da autofagia seletiva mediada por p62/SQSTM1 (Dasgeb et al., 2018; Cereghini, 1996). Esse processo leva à ativação do Nrf2 e à subsequente liberação de GDF-15, fator que modula a resposta inflamatória e atua também como biomarcador em condições associadas a disfunção mitocondrial e inflamação (Weng *et al.*, 2021; Demidowich et al., 2020).

Além dos efeitos periféricos, a colchicina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), embora em concentrações limitadas, devido à atuação da glicoproteína P (Heurtaux et al., 2022; Avdeef et al., 2001; Evrard et al., 1998; Juliano; Ling, 1976; Shin et al., 2019). Evrard *et al.* (1998) demonstraram que, quatro horas após administração intravenosa, a colchicina se acumulava preferencialmente no hipocampo, onde sua concentração intracelular era até dez vezes maior do que no líquido extracelular dessa região e 2,8 vezes superior à de outras regiões cerebrais.

Diante dessas evidências, de que a colchicina ativa o Nrf2 por meio da despolimerização dos microtúbulos, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) e de que astrócitos, micróglia e neurônios expressam Nrf2 e seu regulador negativo Keap1, investigamos no presente estudo, se baixas concentrações não tóxicas de colchicina, já reconhecida como ativadora do Nrf2 em hepatócitos, seriam capazes de promover efeitos antioxidante e anti-inflamatório, além de modular a estrutura e a atividade mitocondrial, bem como os processos

de apoptose e morte celular em células do sistema nervoso central, como astrócitos e células PC12.

Através das análises realizadas pelo ensaio de MTT, verificou-se que as concentrações de 0,312 μM , 0,156 μM e 0,07815 μM não reduziram significativamente a viabilidade celular em nenhuma das duas linhagens (PC12 e Astrócitos). Adicionalmente, foram calculados os valores de IC_{50} para cada tipo celular, sendo 1,196 μM para astrócitos e 5,592 μM para células PC12. Ressalta-se que as concentrações utilizadas nos testes posteriores foram significativamente inferiores aos respectivos valores de IC_{50} . As mesmas concentrações foram aplicadas às duas linhagens com o intuito de simular, de forma aproximada, um ambiente biológico mais complexo, no qual a colchicina, ao atravessar a BBB, atingiria tanto astrócitos quanto células semelhantes às PC12, expondo-as a níveis semelhantes do composto.

Estudos avaliando diretamente o impacto da colchicina na viabilidade de astrócitos ainda são limitados. Contudo, Rao et al., (2021), demonstraram que a administração intracerebro-ventricular de colchicina (7,5 μM) em ratos modelo de Alzheimer provocou uma redução na contagem de astrócitos viáveis no tecido cerebral. Outros trabalhos (Essawy et al., 2019; Joy et al., 2019) também relataram um aumento na ativação de astrócitos, especialmente na região do córtex pré-frontal, após administração intracerebral de colchicina em concentrações igualmente elevadas (7,50 μM). Vale destacar que os estudos mencionados utilizaram doses muito superiores às empregadas no presente trabalho, além de vias de administração diretas no cérebro, o que difere substancialmente da abordagem *in vitro* com baixas concentrações. Essa discrepância metodológica pode justificar a divergência entre os resultados obtidos.

Em relação às células PC12, Takadera; Nakajima; Kanai, (2010) investigaram os efeitos citotóxicos da colchicina por meio da quantificação da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular, indicador clássico de dano à membrana plasmática. Os autores observaram que a concentração de 0,1 μM de colchicina, após 24 horas de tratamento, promoveu um aumento significativo na liberação de LDH, indicando comprometimento da integridade celular. Além disso, o dano celular induzido foi dose-dependente. Esse achado foi diferente do trabalho atual, uma vez que concentrações maiores, por exemplo as concentrações utilizadas nos demais ensaios (0,312, 0,156 e 0,07815 μM) já não afetavam de forma significativa a viabilidade da célula. Essa divergência pode ser atribuída a diferenças metodológicas entre os estudos, como o tipo de ensaio empregado (liberação de LDH versus viabilidade celular por MTT) ou mesmo as condições específicas da cultura celular.

Lindenboim; Haviv e Stein, 1995 ao investigarem os mecanismos de indução de apoptose por diferentes substâncias, incluindo a colchicina, observaram que a exposição a 25,1 μM de colchicina durante 24 horas reduziu significativamente a viabilidade celular, atingindo $46 \pm 2\%$ (SD) conforme determinado pelo ensaio de MTT. No presente estudo, não foram testadas concentrações superiores a 10 μM , porém verificou-se que essa concentração já resultava em uma viabilidade semelhante (aproximadamente 46,57%). Dessa forma, não se fez necessário o uso de concentrações mais elevadas, considerando que o objetivo era identificar concentrações que não comprometessem significativamente a viabilidade celular.

Larsson et al., (2020) investigaram fatores que influenciam a reprodutibilidade e a confiabilidade do ensaio de viabilidade celular por MTT. Os autores destacaram variáveis críticas como a temperatura de armazenamento da substância após diluição em DMSO, o tempo decorrido desde a diluição, a concentração de DMSO (sendo recomendado não ultrapassar 1%) e a qualidade da placa de 96 poços utilizada. Foi constatado que, com o aumento dos dias de armazenamento, os valores de IC50 tendem a diminuir. Além disso, a temperatura de conservação (4 °C ou -20 °C) também alterava os valores de IC50, mesmo para o mesmo período de armazenamento. Por fim, apontaram que a concentração da substância testada era o principal determinante da resposta de viabilidade celular.

Dessa forma, diferenças metodológicas entre os estudos, como a concentração utilizada, a diluição em DMSO, o tempo e a forma de armazenamento da substância, entre outros, podem justificar as divergências nos resultados observados tanto para astrócitos quanto para células PC12. No presente estudo, destaca-se que a colchicina era sempre diluída imediatamente antes do uso, o que pode ter contribuído para a consistência dos dados obtidos.

Para avaliar o estresse oxidativo citosólico, foi utilizado o ensaio com marcação por DCFH-DA. Em ambas as linhagens celulares estudadas (astrócitos e PC12), o LPS aumentou de forma estatisticamente significativa o estresse oxidativo citosólico. Em relação ao tratamento com colchicina, as três concentrações testadas (Col1: 0,312 μM ; Col2: 0,156 μM ; Col3: 0,078 μM) conseguiram reduzir o estresse oxidativo desencadeado pelo LPS nas linhagens de astrócitos e de PC12. Sugerindo-se que a colchicina, nas concentrações e no tempo aqui estudados, apresentou efeito antioxidante em ambas as linhagens avaliadas. Estudos que tenham avaliado diretamente os efeitos da colchicina nesse tipo de ensaio com marcação por DCFH DA, especificamente em astrócitos ou em células PC12, são limitados, uma vez que não foram encontrados registros na literatura. No entanto, em outros tipos celulares, Zhou et al., (2023) demonstraram que a colchicina protege células endoteliais do estresse oxidativo induzido por

etanol e Zhang; Feng; Jiang, (2021) evidenciaram efeito antioxidante da colchicina em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

Além disso, outros ativadores de Nrf2, como a troglitazona (Zhang et al., 2025), a fucoxantina — um derivado de algas marrons (Lee et al., 2023), compostos da planta *Dictamnus dasycarpus* (Bettioli et al., 2021) e substâncias oriundas da planta *Sargassum serratifolium* (Yoon; Yoon; Jun, 2021) apresentaram efeito antioxidante no mesmo teste por marcação com DCFH-DA em células PC12. Para os astrócitos, o ativador de Nrf2 11-keto- β -boswellic acid (KBA), um ácido proveniente do extrato de *Boswellia serrata*, também apresentou efeito antioxidante no ensaio com DCFH-DA (Ding et al., 2014).

A avaliação do estresse oxidativo em ambiente extracelular (meio condicionado) nas linhagens de astrócitos e PC12 revelou que a exposição ao LPS (50 μ g/mL) por 24 horas não promoveu elevação significativa nos níveis extracelulares de NO_2^- , embora após 48 horas tenha sido observada aumento estatisticamente significativo entre os grupos LPS. O tratamento com colchicina, por sua vez, reduziu esses níveis de forma discreta e sem significância estatística em relação ao LPS. Considerando a comparação LPS 24hx 2ª Momento, alguns os grupos tratados com colchicina ainda apresentaram elevação de NO_2^- estatisticamente significativa. Dessa forma, a colchicina não apresentou efeito antioxidante neste ensaio.

Por outro lado, a análise do estresse oxidativo intracelular por DCFH-DA e por dosagem dos níveis de (NO_2^-) não foram completamente congruentes, tanto para astrócitos quanto para a linhagem PC12. O ensaio com DCFH-DA evidenciou aumento estatisticamente significativo do estresse oxidativo induzido pelo LPS, seguido de diminuição após o tratamento com colchicina em ambas as linhagens. Por outro lado, as alterações observadas na dosagem de (NO_2^-) (aumento pelo LPS e redução pela colchicina) não apresentaram significância estatística. Deve-se salientar que o DCFH-DA detecta diretamente o acúmulo de ROS dentro das células, enquanto a dosagem de NO_2^- reflete indiretamente a atividade da iNOS e a liberação de espécies reativas de nitrogênio no meio extracelular, isto é, no meio de cultura. Essa diferença metodológica pode explicar a divergência entre os resultados dos ensaios.

Miljkovic et al., (2004) reforçam essa interpretação, no qual apontam que os níveis de ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) em astrócitos podem ser elevados em resposta a estímulos inflamatórios que aumentam a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Diferentemente do presente estudo, os autores observaram que o pré-tratamento dos astrócitos com colchicina (0,1 e 1 μ M), 15 minutos antes da estimulação com taxol, reduziu de forma estatisticamente significativa os níveis de nitrito. Os pesquisadores sugerem que agentes desestabilizadores de microtúbulos, como a colchicina, podem modular a expressão de iNOS. Quanto à linhagem PC12, ainda não

foram encontrados estudos na literatura que avaliem o efeito da colchicina na produção de (NO_2^-) utilizando essa célula.

Pesquisas que utilizaram outros ativadores de Nrf2 apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo. Em astrócitos, Narayanan et al., (2015) demonstraram que o resveratrol reduziu significativamente a produção de (NO_2^-) em amostras mitocondriais. Em relação à linhagem PC12, Li et al., (2007) evidenciaram que a ativação de Nrf2 pela terc-butilhidroquinona aumentou significativamente os níveis da enzima antioxidante heme oxigenase-1 (HO-1), contribuindo para a redução de marcadores de estresse oxidativo, incluindo (NO_2^-). Corroborando esses achados, Vargas et al., (2006) sugerem que a ativação de Nrf2 diminui os níveis de espécies reativas de nitrogênio, como (NO_2^-), ao estimular a expressão de enzimas antioxidantes, como a HO-1, e as vias de síntese de glutathiona.

Para a determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , foi empregada a técnica de ELISA, conforme o protocolo do fabricante (BioLegend ELISA MAXTM Deluxe Set). Nos astrócitos, ambas as concentrações de colchicina testadas foram capazes de reduzir os níveis das citocinas mencionadas no meio condicionado e no homogenato celular, cujos níveis estavam aumentados após a exposição ao LPS (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Ressalta-se que significância estatística foi observada apenas na dosagem de TNF- α no meio condicionado, ao comparar os grupos LPS \times LPS + Col₂ (0,156 μM). Esses resultados sugerem que a colchicina, nas concentrações e no tempo avaliados, pode exercer um efeito anti-inflamatório, principalmente pela redução nos níveis de TNF- α em astrócitos ativados com LPS.

Para a linhagem PC12, a exposição a LPS 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas não causou alterações estatisticamente significativas nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , tanto no meio condicionado quanto no homogenato celular. Além disso, a colchicina também não provocou modificações estatisticamente significativas nesses níveis. Apesar da ausência de significância estatística, observa-se que a concentração Col₂ (0,156 μM) apresentou aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α no meio condicionado. Portanto, sugere-se que, nas concentrações e tempo testados neste estudo, a colchicina não altera os níveis de citocinas pró-inflamatórias em células PC12, as quais também não foram estimuladas com LPS 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Nosso estudo, é pioneiro quanto a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em homogenato celular ou meio condicionado de astrócitos tratados com colchicina, e com outros ativadores de Nrf2. Essa lacuna também se aplica à linhagem PC12, com exceção do estudo de Kahremany et al., (2019), no qual um composto sintético ativador de Nrf2 causou uma redução dos níveis de citocinas IL-6 e IL-8 em homogenato celular de PC12 estimuladas com LPS. Esse achado diferiu em

relação ao presente trabalho, haja vista que a colchicina, um ativador de Nrf2, não alterou os níveis das citocinas pró-inflamatórias avaliadas nas células PC12.

Além disto, foi evidenciado o LPS 50 µg/mL por 24 horas aumentou os níveis das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α em astrócitos, enquanto esse efeito não foi observado nas células PC12. O LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*) estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias principalmente por meio da ativação do Toll-Like Receptor 4 (TLR4), que reconhece o LPS como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP). A estrutura do LPS é composta por um antígeno O, um oligossacarídeo central e um lipídio A, sendo esta última porção a responsável pelo reconhecimento pelo TLR4. A ligação entre LPS e TLR4 envolve a formação de um complexo com os correceptores MD-2 e CD14. (Lan et al., 2022; Nebel et al., 2012). Nesse processo, o CD14 atua tanto como receptor do LPS quanto como adaptador que transfere o LPS ao TLR4, iniciando a cascata de sinalização (Da Silva Correia et al., 2001).

Após a formação do complexo LPS-CD14-MD-2-TLR4, o TLR4 dimeriza, o que resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras intracelulares, como a proteína MyD88 (gene 88 da resposta primária à diferenciação) e outras proteínas adaptadoras contendo domínio TIR (Jeyaseelan et al., 2007; Khan et al., 2017). A via de sinalização dependente de MyD88 ativa diversas cascatas intracelulares a jusante, levando à ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). O NF-κB atua como fator de transcrição, iniciando a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF-α e IL-1β (Nebel et al., 2012; Zhuang et al., 2020).

Diante disso, avaliam-se os níveis de expressão de TLR4 e de CD14 nos astrócitos e nas PC12. Tarassishin; Suh; Lee, (2014) evidenciaram que astrócitos aumentam significativamente a expressão de CD-14 após estímulo com LPS, o qual, como foi mencionado anteriormente, facilita o reconhecimento e endocitose do LPS por meio do TLR4. No entanto, apesar das PC12 expressarem TLR4 funcional, os níveis de expressão de TLR4 e seu acoplamento com o CD-14 são diferentes daqueles que acontecem nos astrócitos, durante a exposição ao LPS (PARK et al., 2017). (Dong et al., 2014) sugerem que há uma alta expressão constitutiva de CD-14 nos astrócitos em comparação a linhagem PC12, além de que a expressão de TLR4 na superfície da célula depende da cooperação com o CD14, a qual já não é bastante pronunciada na PC12. Todos esses fatores podem tornar o astrócito mais sensível que a PC12 nas vias de sinalização induzidas por LPS, portanto esses fatores podem explicar o motivo pelo qual astrócitos expressaram citocinas após exposição ao LPS, ao passo que o mesmo não ocorreu com a PC12. Outro ponto que corrobora a ideia de maior sensibilidade de astrócito se encontra nos ensaios de marcação com DCFH-DA e Rho, em que fica evidenciado maior grau de ativação dos astrócitos, em comparação à linhagem PC12.

Para avaliar os efeitos da colchicina na permeabilidade transitória da mitocôndria (MPT), foi induzido o *swelling* mitocondrial por meio da adição de íons Ca^{2+} . O poro de permeabilidade transitória da mitocôndria (MPTP) regula a entrada de íons Ca^{2+} no interior da mitocôndria. Quando ocorre desregulação ou abertura sustentada desse poro, há entrada excessiva desses íons, provocando aumento da pressão osmótica devido à atração exercida pelos íons sobre o líquido mitocondrial. Como consequência, ocorre o inchaço mitocondrial (*swelling*). A diminuição dos valores de absorbância (A), medidos a 540 nm ao longo do tempo, indica o inchaço mitocondrial. Dessa forma, valores elevados de ΔA ($A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}$) refletem uma redução acentuada da absorbância ao longo do tempo, indicando *swelling* da mitocôndria (Araújo et al., 2022; Tahara; Navarete; Kowaltowski, 2009).

Diante disso, em relação aos astrócitos, tanto o LPS quanto a associação LPS + Col₁ (0,312 μM) provocaram uma discreta elevação nos valores de ΔA , embora sem significância estatística. Já os grupos LPS + Col₂ (0,156 μM) e LPS + Col₃ (0,078 μM) apresentaram uma leve redução nos valores de ΔA , também sem significância estatística. Dessa forma, conclui-se que a colchicina não exerceu efeito sobre a permeabilidade transitória das mitocôndrias de astrócitos. Na linhagem PC12, observou-se uma discreta redução nos valores de ΔA induzida pelo LPS, sem atingir significância estatística. No entanto, as três concentrações de colchicina (0,312; 0,156 e 0,07815 μM), em associação com o LPS, promoveram uma redução estatisticamente significativa dos valores de ΔA nas células PC12, de forma inversamente proporcional à concentração. Ou seja, quanto menor a concentração de colchicina, maior foi a redução observada.

Esse efeito sugere que a colchicina diminuiu a permeabilidade transitória mitocondrial a níveis inferiores aos do grupo controle (valor basal) nessas linhagens celulares. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que, neste estudo, o tratamento com LPS (50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h) não foi suficiente para provocar um aumento acentuado da permeabilidade mitocondrial — isto é, não gerou um ΔA elevado. Caso isso tivesse ocorrido, seria plausível esperar que a colchicina revertisse esse aumento até níveis basais. Assim, a ausência de um aumento expressivo induzido pelo LPS pode justificar a redução aparente da permeabilidade mitocondrial a valores inferiores aos basais após o tratamento com colchicina.

Os estudos que avaliam diretamente o impacto da colchicina no inchaço mitocondrial de astrócitos e de células PC12 são limitados, pois não se encontram pesquisas que tenham realizado ensaio de *swelling* mitocondrial, em astrócito ou em PC12, após tratamento com colchicina, tampouco que tenham sido tratados com outros ativadores de Nrf2. No entanto, pesquisas sugerem que a colchicina provoca um inchaço da mitocôndria na linhagem PC12,

como consequência do aumento de MPT, muito embora não tenham feito ensaio de swelling mitocondrial (Takadera; Nakajima; Kanai, 2010). Os autores sugerem que ela provoca esse inchaço, uma vez que constataram aumento dos eventos de apoptose e de ativação de caspase 3 após tratamento de PC12 com colchicina. O inchaço mitocondrial ocorre durante um processo de apoptose, esse aumento de volume da mitocôndria provoca a liberação de fatores pró apoptóticos ao citoplasma da célula, como Citocromo C, que ativa as caspases e estimula o evento de morte celular (Lee et al., 2000). Portanto, eles sugerem uma via de apoptose dependente de mitocôndria, envolvendo um aumento do volume mitocondrial. o potencial de agentes antioxidantes e ativadores da via Nrf2 em preservar a função mitocondrial.

Uma possível explicação para a divergência entre os resultados seria a concentração de colchicina empregada em cada estudo. No presente trabalho, foram determinadas concentrações que não afetassem a viabilidade da célula no ensaio do MTT, a partir desse momento foram feitos os demais ensaios. De maneira contrária, (Takadera; Nakajima; Kanai, 2010) empregaram concentrações que prejudicavam a viabilidade da célula de maneira significativa. De fato, como foi mencionado anteriormente, para uma dada substância, a concentração é o principal fator que influência o resultado de viabilidade nos ensaios (Larsson *et al.*, 2020).

O aumento de volume da mitocôndria é acompanhado por alterações no potencial mitocondrial (Niquet; Liu; Wasterlain, 2005; You et al., 2024). No presente trabalho, o potencial mitocondrial foi medido por meio da marcação com rhodamina 123, sendo parte do ensaio realizado em citometria de fluxo. Nos astrócitos, as 3 concentrações de colchicina (0,312, 0,156 e 0,078 μM) não foram capazes de aumentar o potencial mitocondrial ao mesmo valor que o grupo controle, na verdade, eles intensificaram ainda mais o efeito do LPS, isto é, diminuíram ainda mais o potencial mitocondrial. Isso pode ter ocorrido devido a um efeito 95 cumulativo do LPS e da colchicina. O LPS causa um estresse a célula, além do mais, a presença de alguma substância, como a colchicina, também pode ser um fator estressor. Deve-se ter em mente que no ensaio do MTT as células inicialmente estavam viáveis, não tinham passado pelo estresse de exposição ao LPS, de maneira contrária ao ensaio com rhodamina 123, no qual as células já tinham sido expostas ao LPS, portanto poderiam estar mais sensíveis ao serem expostas a uma outra substância. Diante disso, sugere-se que a colchicina, na concentração e no tempo estudados, não consegue restaurar o potencial mitocondrial dos astrócitos expostos ao LPS.

Tratando-se da linhagem de PC12, o LPS causou uma diminuição do potencial mitocondrial. Diante disso, a colchicina foi capaz de aumentar o potencial mitocondrial, porém somente a Col2 (0,156 μM) permaneceu semelhante ao controle, as demais Col1 (0,312 μM) e

Col3 (0,078 μ M) aumentaram significativamente até mesmo em comparação ao controle. Isso sugere que a colchicina exerce efeito no potencial mitocondrial de células do SNC, tem-se um efeito benéfico supostamente em uma célula neuronal, como ficou evidenciado aqui por meio das células PC12. Li et al. (2007) e Vargas et al. (2006) demonstraram que a ativação de Nrf2 melhora a estabilidade mitocondrial e reduz o estresse oxidativo. Considerando que a colchicina pode modular indiretamente essa via, seus efeitos observados aqui sobre a permeabilidade mitocondrial podem refletir tal ação antioxidante indireta, especialmente na linhagem PC12.

Estudos avaliando o impacto da colchicina no potencial de membranas mitocondriais são limitados, não existe pesquisa que tenha avaliado isso diretamente em células PC12 ou em astrócitos. No entanto, utilizando células tumorais hepáticas (HepG2), Sheldon et al., (2011) evidenciaram uma redução de 50-70% no potencial de membrana da mitocôndria devido a substâncias desestabilizadoras de microtúbulos, como a colchicina. Esse resultado foi diferente do presente trabalho, uma possível explicação seria as diferentes concentrações de colchicina empregadas. Os autores utilizaram uma concentração que intencionalmente prejudicou a viabilidade da célula tumoral (10 μ M), não sendo feito o mesmo no presente trabalho, não esquecendo de mencionar também que se tratava de células e objetivos de estudo diferentes. Além do mais, corroborando com o presente trabalho, pesquisa envolvendo flavonoides presentes em *Polypodium hastatum*, os quais são ativadores de Nrf2, restauraram a função e o potencial mitocondriais nas células PC12 (Yao et al., 2024).

Em relação aos astrócitos, empregando outros ativadores de Nrf2, (Wu et al., 2019) evidenciaram uma diminuição do estresse oxidativo e uma restauração do potencial mitocondrial, efeitos os quais foram por conta da neferina, destacando a via do Nrf2 na viabilidade mitocondrial de astrócitos. (Morales-Rosales et al., 2021) sugerem que estresse oxidativo e função mitocondrial prejudicada estão relacionados a diminuição do potencial de membrana da mitocôndria nos astrócitos. De fato, no presente trabalho, estresse oxidativo também ocorreu, como evidenciado pela marcação com DCFH-DA, juntamente com diminuição de potencial da mitocôndria, porém a colchicina não restaurou o potencial, apesar de ter diminuído o estresse oxidativo citosólico.

Pesquisas indicam uma relação entre potencial da membrana mitocondrial, tumescência da mitocôndria e apoptose nos mecanismos de morte celular (Kwong; Molkentin, 2015; Pastorino et al., 1999; Schinzel et al., 2005). Pastorino *et al.* (1999). A diminuição do potencial mitocondrial seria um indicador inicial do processo de apoptose, essa diminuição, além do mais, prejudica o processo de síntese de ATP e demais processos metabólicos. Além disto, ela desencadeia uma abertura do poro de permeabilidade transitória, o que permite maior influxo

de solutos, por exemplo íons Ca^{2+} , levando a uma entrada desregulada de líquido para dentro da mitocôndria. Por conseguinte, a mitocôndria tem seu volume aumentado e, por último, sofre apoptose.

Zhao; Ji e Mao (2012) sugerem que diminuição do potencial mitocondrial é associado com indução de apoptose em células hepáticas, tal diminuição foi relacionada também com liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo C a partir da mitocôndria. Eles também evidenciaram que ativação do poro de permeabilidade transitória provoca um aumento de volume da mitocôndria e uma liberação de citocromo c, destacando o dano inicial a nível de mitocôndria como estímulo para apoptose. Evidências apontam que proteínas pertencentes a família Bcl-2, Bax e Bak, facilitam a abertura do poro de permeabilidade transitória, provocando a tumescência mitocondrial durante a apoptose (Karch et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a colchicina, em concentrações consideradas não citotóxicas para astrócitos e células PC12 previamente expostas ao LPS, apresenta efeitos distintos entre essas duas linhagens celulares. Nos astrócitos, a colchicina exibiu um efeito predominantemente antioxidante e anti-inflamatório, evidenciado pela redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, em parte, das citocinas pró-inflamatórias. No entanto, não foi capaz de restaurar parâmetros relacionados à integridade mitocondrial, como o potencial transmembrânico e o controle da tumescência mitocondrial, apresentando portanto, uma vulnerabilidade da linhagem glial frente à disfunção mitocondrial.

Por outro lado, nas células PC12, a colchicina demonstrou um perfil mais robusto de proteção celular. Além do efeito antioxidante, restaurar o potencial mitocondrial e reduzir a tumescência mitocondrial, indicando uma preservação efetiva da função mitocondrial. Entretanto, os dados também sugerem que, apesar desses efeitos benéficos, não houve redução consistente dos níveis de mediadores inflamatórios, o que sinaliza que o impacto da colchicina sobre a inflamação na linhagem PC12 foi limitado. Assim, os achados reforçam a hipótese de que os efeitos citoprotetores da colchicina são dependentes do tipo celular, refletindo as diferentes características bioenergéticas, funcionais e de sensibilidade ao estresse entre neurônios e células da glia possuem. Ainda, os dados obtidos corroboram com a literatura que associa a modulação da via Nrf2-Keap1 à proteção contra o estresse oxidativo e à manutenção da homeostase celular, destacando a colchicina como um agente modulador dessa via, embora seu impacto completo sobre inflamação e disfunção mitocondrial possa variar conforme o contexto celular.

REFERÊNCIAS

- ADŽIĆ, Miroslav *et al.* Antidepressant Action on Mitochondrial Dysfunction in Psychiatric Disorders. **Drug Development Research**, v. 77, n. 7, p. 400–406, 2016.
- AMOROSO, Rosa; MACCALLINI, Cristina; BELLEZZA, Ilaria. Activators of Nrf2 to Counteract Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 778, 2023.
- ANGELIDIS, Christos *et al.* Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 6, p. 659–663, 2018.
- ARANDA, A. *et al.* Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, 2013.
- ARAÚJO, Ludmila *et al.* Effects of vitamin D (VD3) supplementation on the brain mitochondrial function of male rats, in the 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 154, p. 105280, 2022.
- AVDEEF, Alex *et al.* Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 271–280, 2001.
- AZENABOR, A. *et al.* Plasma Ferritin Levels, Oxidative Stress and Nephropathy in Diabetes. **University of Lagos Journal of Basic Medical Sciences**, v. 6, n. 1 & 2, p. 9–14, 2018.
- BASSI, Pallavi *et al.* Exploring Novel Therapeutic Avenues: Drug Repurposing for Neurodegenerative Movement Disorders. **Current Drug Research Reviews**, v. 16, 2024.
- BETTIOL, Alessandra *et al.* Neutrophil-mediated mechanisms of damage and *in-vitro* protective effect of colchicine in non-vascular Behçet's syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 206, n. 3, p. 410–421, 2021.
- BHAT, Aditi *et al.* Perspective insights of repurposing the pleiotropic efficacy of statins in neurodegenerative disorders: An expository appraisal. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 2, p. 100012, 2021.
- BYRNE, Joseph P. *et al.* Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 10, p. 1967–1985, 2019.
- ÇANKAYA, Nevin; BULDUK, İbrahim; ÇOLAK, Ayşen Melda. Extraction, development and validation of HPLC-UV method for rapid and sensitive determination of colchicine from *Colchicum autumnale* L. Bulbs. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 345–351, 2019.
- CAPIBARIBE, Victor. Avaliação in vivo e in vitro dos efeitos antidepressivo e citoprotetor da Riparina IV em modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. **Repositorio.ufc.br**, 2024.
- CATINI, Alexandro *et al.* A Lab-on-a-Chip Based Automatic Platform for Continuous Nitrites Sensing in Aquaculture. **Sensors**, v. 22, n. 2, 1 jan. 2022.
- CEREGHINI, S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, n. 2, p. 267–282, 1996.

CHANG, Ji Suk *et al.* A map of the PGC-1 α - and NT-PGC-1 α -regulated transcriptional network in brown adipose tissue. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

CHAPA-DUBOCQ, Xavier *et al.* Simple kinetic model of mitochondrial swelling in cardiac cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 7, p. 5310–5321, 1 jul. 2018.

CHAZOTTE, Brad. Labeling mitochondria with rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 6, n. 7, p. 892–894, jul. 2011.

CHEN, Min *et al.* BMSC-Derived Exosomes Carrying miR-26a-5p Ameliorate Spinal Cord Injury via Negatively Regulating EZH2 and Activating the BDNF-TrkB-CREB Signaling. **Molecular Neurobiology**, v. 61, n. 10, p. 8156–8174, 2024.

CHEN, Sheng *et al.* Heme Oxygenase-1-Mediated Autophagy Protects against Oxidative Damage in Rat Nucleus Pulposus-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–14, 2020.

CHEN, Wenna *et al.* Neuroprotective activities of catalpol against CaMKII-dependent apoptosis induced by LPS in PC12 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 5, p. 1140–1152, 2013.

CHISHTY, M. *et al.* Affinity for the P-Glycoprotein Efflux Pump at the Blood-Brain Barrier May Explain the Lack of CNS Side-Effects of Modern Antihistamines. **Journal of Drug Targeting**, v. 9, n. 3, p. 223–228, 2001.

CHISTYAKOV, Dmitry V *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 130, n. 4, p. 563–574, 2014.

CHOWDHRY, S. *et al.* Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3765–3781, 2012.

CULBRETH, Megan; ASCHNER, Michael. GSK-3 β , a double-edged sword in Nrf2 regulation: Implications for neurological dysfunction and disease. **F1000Research**, v. 7, p. 1043, 2018.

CULLINAN, Sara B.; DIEHL, J. Alan. PERK-dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival following Endoplasmic Reticulum Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20108–20117, 2004.

DA SILVA CORREIA, Jean *et al.* Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 24, p. 21129–21135, 2001.

D'AMARIO, Domenico *et al.* Colchicine in ischemic heart disease: the good, the bad and the ugly. **Clinical Research in Cardiology**, v. 110, n. 10, p. 1531–1542, 2021.

DASGEB, B. *et al.* Colchicine: an ancient drug with novel applications. **British Journal of Dermatology**, v. 178, n. 2, p. 350–356, 2018.

DAVIES, Don A.; ADLIMOGHADDAM, Aida; ALBENSI, Benedict C. Role of Nrf2 in Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer's Disease. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1884, 2021.

DE HAAN, Lianne R. *et al.* Experimental Conditions That Influence the Utility of 2'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH2-DA) as a Fluorogenic Biosensor for Mitochondrial Redox Status. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2022.

DEFTEREOS, Spyridon *et al.* Colchicine and the Heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 20, p. 1817–1825, 2013.

DEIVASIGAMANI, Malarvizhi *et al.* Zaleya decandra exerts anti-cancer activity in HCT-116 cancer cells by impairing mitochondrial activity. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 174–180, 14 dez. 2019.

DEMIDOWICH, Andrew P. *et al.* Colchicine's effects on metabolic and inflammatory molecules in adults with obesity and metabolic syndrome: results from a pilot randomized controlled trial. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 44, n. 8, p. 1793, 1 ago. 2020.

DI, Li *et al.* High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 223–232, 2003.

DING, Yi *et al.* Posttreatment with 11-Keto- β -Boswellic Acid Ameliorates Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury: Nrf2/HO-1 Pathway as a Potential Mechanism. v. 52, n. 3, p. 1430–1439, 2014.

DONG, Fenfen *et al.* Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast. **The FEBS Journal**, 2021.

DONG, Hongquan *et al.* Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced microglial activation via inhibition of toll-like receptor 4 expression by activating the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, 2014.

DU, Qixue *et al.* The effect of Co-Q10 on allergic rhinitis and allergic asthma. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 17, n. 1, 2021.

DUAN, Guoqing *et al.* The study of sclareol in inhibiting proliferation of osteosarcoma cells by apoptotic induction and loss of mitochondrial membrane potential. **Cancer Biomarkers**, v. 22, n. 1, p. 29–34, 2018.

EDUARDO E EGEEA, Bashar S. Staitieh; NNAMDI AZIH, Xian Fan. Activation of Alveolar Macrophages with Interferon- γ Promotes Antioxidant Defenses via the Nrf2-ARE Pathway. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 06, n. 05, 2015.

ELISEEV, Maxim S. *et al.* Uric acid, cognitive disorders, neurodegeneration. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 96, n. 5, p. 447–452, 3 jun. 2024.

ELSEWEDY, Heba S. *et al.* Enhancement of Anti-Inflammatory Activity of Optimized Niosomal Colchicine Loaded into Jojoba Oil-Based Emulgel Using Response Surface Methodology. **Gels**, v. 8, n. 1, p. 16, 2021.

ESKANDARI, Kiarash *et al.* Repurposing Sigma-1 Receptor-Targeting Drugs for Therapeutic Advances in Neurodegenerative Disorders. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 5, p. 700, 2025.

ESSAWY, Amina E. *et al.* Soybean isoflavone ameliorates cognitive impairment, neuroinflammation, and amyloid β accumulation in a rat model of Alzheimer's disease. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 26060–26070, 2019.

EVARD, P. A. *et al.* Simultaneous microdialysis in brain and blood of the mouse: extracellular and intracellular brain colchicine disposition. **Brain research**, v. 786, n. 1–2, p. 122–127, 1998.

FALAHIANSHAFIEI, Shiva *et al.* Evaluation of anticancer effect of colchicum autumnale L. Corm on breast cancer cell. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, 2023.

FINE, Noah *et al.* GEF-H1 Is Required for Colchicine Inhibition of Neutrophil Rolling and Recruitment in Mouse Models of Gout. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 12, p. 3300–3310, 2020.

GHANBARIRAD, Maryam *et al.* Nrf2 Dysregulation in Major Depressive and Bipolar Disorders. **Galen Medical Journal**, v. 10, p. e2074–e2074, 2021.

GIOVANNONI, G. *et al.* Adaptation of the Nitrate Reductase and Griess Reaction Methods for the Measurement of Serum Nitrate plus Nitrite Levels. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 34, n. 2, p. 193–198, 1997.

GONZALEZ, Teresa *et al.* 2',7'-dichlorofluorescein-based analysis of Fenton chemistry reveals auto-amplification of probe fluorescence and albumin as catalyst for the detection of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 24, p. 4689–4710, 1 dez. 2020.

GOWING, Stephen D. *et al.* Gram-Negative Pneumonia Augments Non-Small Cell Lung Cancer Metastasis through Host Toll-like Receptor 4 Activation. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, n. 12, p. 2097–2108, 2019.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUERRA, Maria Cristina *et al.* Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, 2011.

GUO, Baojian *et al.* Tetramethylpyrazine nitrone exerts neuroprotection via PGC-1 α /Nrf2 activation and α -synuclein clearance in Parkinson's disease models. **Research Square (Research Square)**, 2020.

HASHEMI, Mehrdad *et al.* Nrf2 Dysregulation in Major Depressive and Bipolar Disorders. **Galen Medical Journal**, v. 10, 2021.

HASHIMOTO, Kenji. Essential Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Mood Disorders: Overview and Future Perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

HE, Bin *et al.* Protective effect of carboxymethylated chitosan on hydrogen peroxide-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1629–1638, 1 mar. 2015.

HE, Jianle *et al.* Activation of SIRT1 by Hydroxysafflor Yellow A Attenuates Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Microglia Activation and Iron Death in Depressed Rats. **Brain and Behavior**, v. 15, n. 3, 2025.

HEURTAUX, Tony *et al.* Normal and Pathological NRF2 Signalling in the Central Nervous System. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1426, 2022.

HIROTSU, Yosuke *et al.* Nrf2–MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 20, p. 10228–10239, 2012.

HOLMSTRÖM, Kira M. *et al.* Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. **Biology Open**, v. 2, n. 8, p. 761–770, 2013.

HORSPPOOL, Alexander M.; CHANG, Howard C. Neuron-specific regulation of superoxide dismutase amid pathogen-induced gut dysbiosis. **Redox Biology**, v. 17, p. 377–385, 2018.

- HUANG, H. C.; NGUYEN, Truyen; PICKETT, Cecil B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42769–42774, 2002.
- HUANG, Ya-Hui *et al.* Proteomic analysis of lipopolysaccharide-induced apoptosis in PC12 cells. **Proteomics**, v. 2, n. 9, 2025.
- ILYAS, Sajida *et al.* Stimulation of Erythrocyte Membrane Blebbing by Naproxen Sodium. **Dose-Response**, v. 18, n. 1, p. 155932581989925, 2020.
- JABALLAH, F. *et al.* Schizophrenia-Like Psychotic Symptoms Associated to Leigh Syndrome. **Case Reports in Psychiatry**, v. 2023, p. 1–5, 2023.
- JAYAKUMAR, A. R. *et al.* Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. **Neuroscience**, v. 218, p. 305–316, 2012.
- JEYASEELAN, Samithamby *et al.* Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF)-Mediated Signaling Contributes to Innate Immune Responses in the Lung during *Escherichia coli* Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3153–3160, 2007.
- JIAN, Zhe *et al.* Heme Oxygenase-1 Protects Human Melanocytes from H₂O₂-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-ARE Pathway. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 7, p. 1420–1427, 2011.
- JIANG, Ying *et al.* Caveolin-1 controls mitochondrial damage and ROS production by regulating fission - fusion dynamics and mitophagy. **Redox Biology**, v. 52, p. 102304, 2022.
- JIAO, Yang *et al.* Protection against HEMA-Induced Mitochondrial Injury *In Vitro* by Nrf2 Activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–13, 2019.
- JOY, Teresa *et al.* Effect of N-Acetyl Cysteine on Intracerebroventricular Colchicine Induced Cognitive Deficits, Beta Amyloid Pathology, and Glial Cells. **Neuroscience Journal**, v. 2019, n. 1, p. 1–15, 2019.
- JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152–162, 1976.
- KADHIM, Fatima; NOORI, Rasha. Role of Oxidative Stress Glutathione Peroxidase in the Detection of Patients with *Echinococcus Granulosus*. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology/Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology**, v. 15, n. 2, p. 585–591, 2023.
- KAHREMANY, Shirin *et al.* Nrf2 Activation by SK-119 Attenuates Oxidative Stress, UVB, and LPS-Induced Damage. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 4, p. 173–181, 2019.
- KAKOTI, Bibhuti Bhusan; BEZBARUAH, Rajashri; AHMED, Nasima. Therapeutic drug repositioning with special emphasis on neurodegenerative diseases: Threats and issues. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
- KANAMOTO, Mayu *et al.* Structural instability of I κ B kinase β promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0203978, 2018.

KARCH, Jason *et al.* Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. **eLife**, v. 2, 2013.

KARLSSON, Markus *et al.* What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? **Biochemical Journal**, v. 428, n. 2, p. 183–190, 1 jun. 2010.

KEUM, Young-Sam *et al.* Mechanism of Action of Sulforaphane: Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Isoforms Contributing to the Induction of Antioxidant Response Element-Mediated Heme Oxygenase-1 in Human Hepatoma HepG2 Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8804–8813, 2006.

KHAN, Meraj A. *et al.* JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

KROEMER, G. The role of mitochondria in apoptosis. **European Journal of Cancer**, v. 35, p. S307, 1999.

KUMAR, Sanjay *et al.* Activation of Mitofusin2 by Smad2-RIN1 Complex during Mitochondrial Fusion. **Molecular Cell**, v. 62, n. 4, p. 520–531, 2016.

KWAN, Kenneth Kin Leung *et al.* Ginsenosides attenuate bioenergetics and morphology of mitochondria in cultured PC12 cells under the insult of amyloid beta-peptide. **Journal of Ginseng Research**, 2020.

KWONG, Jennifer Q.; MOLKENTIN, Jeffery D. Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 206–214, 2015.

LAI, Liyong *et al.* Artemisia annua L. extract regulates bone-fat metabolism on glucocorticoid-induced osteoporosis via regulating PGC-1 α /Nrf2-mediated oxidative stress. 2024.

LAN, Chunhua *et al.* Different expression patterns of inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharides from Escherichia coli or Porphyromonas gingivalis in human dental pulp stem cells. **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, 2022.

LARSSON, Peter *et al.* Optimization of Cell Viability Assays to Improve Replicability and Reproducibility of Cancer Drug Sensitivity Screens. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5798, 2020.

LAVANYA, Narra; SATHYAMURTHY, Immaneni. Colchicine in Cardiovascular Diseases. **Journal of Indian College of Cardiology**, v. 13, n. 4, p. 135–140, 2023.

LEBEDEV, P. A. *et al.* Possibilities and perspectives of colchicine application in complex therapy in patients with COVID-19. **Clinical Medicine (Russian Journal)**, v. 99, n. 3, p. 165–171, 2021.

LEE, Chung Soo *et al.* Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 2, p. 521–531, 2000.

LEE, Ji Yeon *et al.* Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on hydrogen peroxide-stimulated hepatic SNU761 cells. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 58, n. 3, p. 277–282, mar. 2010.

LEE, Nayoung *et al.* The Role of Fucoxanthin as a Potent Nrf2 Activator via Akt/GSK-3 β /Fyn Axis against Amyloid- β Peptide-Induced Oxidative Damage. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 629, 2023.

LEI, Chenxu *et al.* Downregulation of astrocytic C3 production alleviates neuronal mitochondrial dysfunction in tauopathy models. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2024.

LEMASTERS, John J. *et al.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1787, n. 11, p. 1395–1401, 1 nov. 2009.

LEMOS, Natália Emerim *et al.* Comparison of two techniques for assessing pancreatic islet viability: flow cytometry and fluorescein diacetate/propidium iodide staining. **Clinical & Biomedical Research**, 7 dez. 2021.

LEUNG, Ying Ying; YAO HUI, Laura Li; KRAUS, Virginia B. Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 3, p. 341–350, 2015a.

LEUNG, Ying Ying; YAO HUI, Laura Li; KRAUS, Virginia B. Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 3, p. 341–350, 1 dez. 2015b.

LI, Huang Yuan *et al.* NF-E2 Related Factor 2 Activation and Heme Oxygenase-1 Induction by *tert*-Butylhydroquinone Protect against Deltamethrin-Mediated Oxidative Stress in PC12 Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 9, p. 1242–1251, 2007.

LI, Min; ZHANG, Ying; WANG, Jixing. Endoplasmic reticulum stress regulates cell injury in lipopolysaccharide-induced nerve cells. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 9, p. 030006052094976, 2020.

LI, Xia *et al.* Evaluation of Oxidative Status in Elderly Patients with Multiple Cerebral Infarctions and Multiple Chronic Total Coronary Occlusions. **Disease Markers**, v. 2022, p. 1–11, 2022.

LI, Yi *et al.* Songorine promotes cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2 induction during sepsis. v. 38, p. 101771, 2021a.

LI, Yuyu *et al.* Anti-inflammatory mechanisms and research progress of colchicine in atherosclerotic therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 17, p. 8087–8094, 2021b.

LINDENBOIM, Liora; HAVIV, Ronit; STEIN, Reuven. Inhibition of Drug-Induced Apoptosis by Survival Factors in PC12 Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 3, p. 1054–1063, 1995.

LIU, Jian-Xing *et al.* Protection of procyanidin B2 on mitochondrial dynamics in sepsis associated acute kidney injury via promoting Nrf2 nuclear translocation. **Aging**, v. 12, n. 15, p. 15638–15655, 2020.

LIU, Jing *et al.* Downregulation of CIRP Prone Cells to Oxidative Injury via Regulating Nrf2 Signaling Pathway. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–8, 2022.

- LIU, Yanli *et al.* Nrf2 Inhibits Periodontal Ligament Stem Cell Apoptosis under Excessive Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1076, 2017.
- LOUREIRO, Samanta Oliveira *et al.* Dual action of chronic ethanol treatment on LPS-induced response in C6 glioma cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 249, n. 1–2, p. 8–15, 2012.
- LU, Xiaofeng *et al.* Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, 2010.
- LUO, Jing *et al.* Nrf2 Deficiency Exacerbated CLP-Induced Pulmonary Injury and Inflammation through Autophagy- and NF- κ B/PPAR γ -Mediated Macrophage Polarization. **Cells**, v. 11, n. 23, p. 3927, 2022.
- MA, Shuxian; DONG, Zhenming. Melatonin Attenuates Cardiac Reperfusion Stress by Improving OPA1-Related Mitochondrial Fusion in a Yap–Hippo Pathway–Dependent Manner. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 27–39, 2019.
- MACGARVEY, Nancy Chou *et al.* Activation of Mitochondrial Biogenesis by Heme Oxygenase-1-mediated NF-E2-related Factor-2 Induction Rescues Mice from Lethal *Staphylococcus aureus* Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 8, p. 851–861, 2012.
- MAGDALENO, Jorge Y.; GONZÁLEZ, Christian Chapa. Glutamate and excitotoxicity in central nervous system disorders: ionotropic glutamate receptors as a target for neuroprotection. **Deleted Journal**, 2024.
- MANZOOR, Ayesha *et al.* Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* ‘White Prosperity’. **Folia Horticulturae**, v. 30, n. 2, p. 307–319, 2018.
- MATHENY, Christopher J. *et al.* Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications of P-glycoprotein Modulation. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 21, n. 7, p. 778–796, 2001.
- MILJKOVIC, D. *et al.* Taxol activates inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes: the role of MAP kinases and NF- κ B. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 61, n. 10, p. 1167–1175, 2004.
- MOHAN, Shikha; GUPTA, Damodar. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1866–1878, 2018.
- MONDESHKI, Tsanko; MITEV, Vanyo. High-Dose Colchicine: Key Factor in the Treatment of Morbidly Obese COVID-19 Patients. **Cureus**, v. 16, n. 4, 13 abr. 2024.
- MORALES-ROSALES, Sandra Lizbeth *et al.* Senescence in Primary Rat Astrocytes Induces Loss of the Mitochondrial Membrane Potential and Alters Mitochondrial Dynamics in Cortical Neurons. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 2021.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOUSTAPHA, Aoula. Neurodegenerative Diseases: Potential Effect of Glutathione. **Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease**, 26 ago. 2020.

MUREŞAN, Mariana *et al.* Comparative Study of the Pharmacological Properties and Biological Effects of *Polygonum aviculare* L. herba Extract-Entrapped Liposomes versus Quercetin-Entrapped Liposomes on Doxorubicin-Induced Toxicity on HUVECs.

Pharmaceutics, v. 13, n. 9, p. 1418, 2021.

MURI, Jonathan *et al.* Electrophilic Nrf2 activators and itaconate inhibit inflammation at low dose and promote IL-1 β production and inflammatory apoptosis at high dose. **Redox Biology**, v. 36, p. 101647, 2020.

NAGASHIMA, Ryuichi *et al.* Nrf2 Suppresses Allergic Lung Inflammation by Attenuating the Type 2 Innate Lymphoid Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 5, p. 1331–1339, 2019.

NARAYANAN, Srinivasan V *et al.* Resveratrol Preconditioning Protects Against Cerebral Ischemic Injury via Nuclear Erythroid 2–Related Factor 2. **Stroke**, v. 46, n. 6, p. 1626–1632, 2015.

NEBEL, Daniel *et al.* Differential effects of LPS from *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* on IL-6 production in human periodontal ligament cells. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 3–4, p. 892–898, 2012.

NEYMOTIN, Arie *et al.* Neuroprotective effect of Nrf2/ARE activators, CDDO ethylamide and CDDO trifluoroethylamide, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 88–96, 2011.

NIQUET, Jerome; LIU, Hantao; WASTERLAIN, Claude G. Programmed Neuronal Necrosis and Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 46, n. s5, p. 43–48, jul. 2005.

OSAMA, Alsiddig *et al.* Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. **Ageing Research Reviews**, v. 64, p. 101206, 2020.

O'MEALEY, Gary B.; BERRY, William L.; PLAFKER, Scott M. Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. **Redox Biology**, v. 11, p. 103–110, 2016.

PAI, Su Cheng *et al.* Determination of Nitrate in Natural Waters by Vanadium Reduction and the Griess Assay: Reassessment and Optimization. **ACS ES&T Water**, v. 1, n. 6, p. 1524–1532, 11 jun. 2021.

PANDEY, D. K. *et al.* Improved Growth And Colchicine Concentration In *Gloriosa Superba* On Mycorrhizal Inoculation Supplemented With Phosphorus-Fertilizer. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 2, p. 439, 2014.

PAPPRITZ, Kathleen *et al.* Colchicine prevents disease progression in viral myocarditis via modulating the NLRP3 inflammasome in the cardiosplenic axis. **ESC heart failure**, v. 9, n. 2, p. 925–941, 2022.

PASTORINO, John G. *et al.* Functional Consequences of the Sustained or Transient Activation by Bax of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 44, p. 31734–31739, 1999.

PETSOUKI, Eleni *et al.* AMPK-Mediated Phosphorylation of Nrf2 at S374/S408/S433 Favors Its β TrCP2-Mediated Degradation in KEAP1-Deficient Cells. **Antioxidants**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2023.

- PI, Jingbo *et al.* Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1797–1806, 2007.
- PIRAS, Sabrina *et al.* Differentiation impairs Bach1 dependent HO-1 activation and increases sensitivity to oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- POKORNÝ, Jiří *et al.* Targeting mitochondria for cancer treatment - two types of mitochondrial dysfunction. **Prague medical report**, v. 115, n. 3–4, p. 104–119, 2014.
- QU, Zhuo *et al.* Transcription factor NRF2 as a promising therapeutic target for Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 159, p. 87–102, 2020.
- RAHMAWATI, S. I. *et al.* Determination colchicine content in aquadest-extracted Gloriosa superba seed from Sukoharjo and Gunung Kidul. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 142, p. 012053, 2018.
- RAO, Y. Lakshmisha *et al.* Comparison of malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in resveratrol and resveratrol/donepezil combination treatment groups in Alzheimer's disease induced rat model. **3 biotech**, v. 11, n. 7, 2021.
- RAUSCHER, Frederick M.; SANDERS, Ruth A.; WATKINS, John B. Effects of new antioxidant compounds PNU-104067F and PNU-74389G on antioxidant defense in normal and diabetic rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 14, n. 4, 2025.
- REBOUÇAS, Manoela. Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do alfa-Bisabolol em modelos in vivo e in vitro de indução por lipopolissacarídeo. **Repositorio.ufc.br**, 2024.
- REINIERS, Megan J. *et al.* Analysis and optimization of conditions for the use of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate in cultured hepatocytes. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, 1 maio 2021.
- ROUBILLE, Francois *et al.* Colchicine: An Old Wine in a New Bottle? **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 14–23, 2013.
- SAHA, Sarmistha *et al.* A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, 2022.
- SALEH, Mohammed A. A. *et al.* Using the LeiCNS-PK3.0 Physiologically-Based Pharmacokinetic Model to Predict Brain Extracellular Fluid Pharmacokinetics in Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 11, p. 2555–2566, 1 nov. 2023.
- SANI, Gabriele *et al.* The Nrf2 Pathway in Depressive Disorders: A Systematic Review of Animal and Human Studies. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 817, 2023.
- SCHINZEL, Anna C. *et al.* Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12005–12010, 2005.
- SEOL, Song-I. *et al.* Taurine Chloramine-Mediated Nrf2 Activation and HO-1 Induction Confer Protective Effects in Astrocytes. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 169, 2024.

SHELDON, Kely L. *et al.* Phosphorylation of Voltage-Dependent Anion Channel by Serine/Threonine Kinases Governs Its Interaction with Tubulin. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25539–e25539, 2011.

SHIN, Seulgi *et al.* Development of an Aryloxazole Derivative as a Brain-Permeable Anti-Glioblastoma Agent. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 497, 2019.

SHIRAKAWA, Hitoshi *et al.* Fermented barley extract supplementation ameliorates metabolic state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 79, n. 11, p. 1876–1883, 2015.

SHUKLA, Kirtikar *et al.* Aldose Reductase Inhibitor Protects against Hyperglycemic Stress by Activating Nrf2-Dependent Antioxidant Proteins. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SIMON-MOLAS, Helga *et al.* The Expression of TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Can Be Controlled by the Antioxidant Orchestrator NRF2 in Human Carcinoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1905, 2022.

SIVANDZADE, Farzane *et al.* NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. **Redox Biology**, v. 21, p. 101059, 2019.

SPRYN, K. R.; SABADASHKA, M. V.; SYBIRNA, N. O. Effects of agmatine and red wine concentrate, enriched with polyphenolic compounds, on L-arginine / nitrogen oxide system in the brain of rats with experimental diabetes mellitus. **Studia Biologica**, v. 15, n. 2, p. 25–34, 2021.

SUN, Jia *et al.* Nrf2 Activation Attenuates Chronic Constriction Injury-Induced Neuropathic Pain via Induction of PGC-1 α -Mediated Mitochondrial Biogenesis in the Spinal Cord. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, 2021.

SUN, Jie *et al.* Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, 2003.

SUN, Meiqi *et al.* Leptin reduces LPS-induced A1 reactive astrocyte activation and inflammation via inhibiting p38-MAPK signaling pathway. **Glia**, v. 73, n. 1, p. 25–37, 2025.

SUN, Xiao-Long *et al.* Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 2016.

SÜZEN, Sibel *et al.* A Pivotal Role of Nrf2 in Neurodegenerative Disorders: A New Way for Therapeutic Strategies. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 692, 2022.

TAHARA, Erich B.; NAVARETE, Felipe D. T.; KOWALTOWSKI, Alicia J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1283–1297, 1 maio 2009.

TAKADERA, Tsuneo; NAKAJIMA, Yu; KANAI, Yuki. Colchicine-Induced Apoptosis Was Prevented by Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors in PC12 Cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 863–868, 2010.

TANG, Zehan *et al.* Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 7, 2019.

- TARASSISHIN, Leonid; SUH, Hyeon-Sook; LEE, Sunhee C. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14. **Glia**, v. 62, n. 6, p. 999–1013, 2014.
- TENNAKOON, Jayantha B. *et al.* Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 α -mediated metabolic switch. **Oncogene**, v. 33, n. 45, p. 5251–5261, 2013.
- TREVISAN, Tatiana *et al.* Manipulation of Mitochondria Dynamics Reveals Separate Roles for Form and Function in Mitochondria Distribution. **Cell Reports**, v. 23, n. 6, p. 1742–1753, 2018.
- VARGAS, Marcelo R. *et al.* Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 3, p. 687–696, 2006.
- VEERENDRA KUMAR, M. H.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular administration of colchicine produces cognitive impairment associated with oxidative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 565–571, 2002.
- WAHL, M.; KOOPMANN, I.; AMMON, T. Oxidative stress causes depolarization and calcium uptake in the rat insulinoma cell RINm5F. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 106, n. 03, p. 173–177, 2009.
- WAN, X. Steven *et al.* Standardization of a fluorometric assay for measuring oxidative stress in irradiated cells. **Radiation Research**, v. 163, n. 2, p. 232–240, fev. 2005.
- WANG, Peng *et al.* Selenium Attenuates TBHP-Induced Apoptosis of Nucleus Pulposus Cells by Suppressing Mitochondrial Fission through Activating Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–20, 2022.
- WANG, Ruihong; LIU, Yang; JING, Li. MiRNA-99a alleviates inflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-stimulated PC-12 cells and rats post spinal cord injury. **Bioengineered**, v. 13, n. 2, p. 4248–4259, 2022.
- WANG, Shu *et al.* Automated determination of nitrate plus nitrite in aqueous samples with flow injection analysis using vanadium (III) chloride as reductant. **Talanta**, v. 146, p. 744–748, 1 jan. 2016.
- WANG, Yan *et al.* Resveratrol ameliorates sepsis-induced acute kidney injury in a pediatric rat model via Nrf2 signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2018.
- WANG, Yiru *et al.* HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. **Aging**, 2019.
- WENG, Jui-Hsia *et al.* Colchicine acts selectively in the liver to induce hepatokines that inhibit myeloid cell activation. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 513–522, 2021.
- WU, Chuanhong *et al.* Mitochondrial protective effect of neferine through the modulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signalling in ischaemic stroke. v. 176, n. 3, p. 400–415, 2019.
- WU, Shouhai; ZHANG, Tianpeng; DU, Jingsheng. Ursolic acid sensitizes cisplatin-resistant HepG2/DDP cells to cisplatin via inhibiting Nrf2/ARE pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3471–3481, 2016.
- XIAN, Panpan *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a nanotherapeutic agent for amelioration of inflammation-induced astrocyte alterations in mice. **Theranostics**, v. 9, n. 20, p. 5956–5975, 2019.

XIE, Danni *et al.* The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, 2023.

XIE, Yunjie *et al.* Chinese Angelica Polysaccharide (CAP) Alleviates LPS-Induced Inflammation and Apoptosis by Down-Regulating COX-1 in PC12 Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1380–1388, 2018.

YAMAMOTO, Masayuki; KENSLER, Thomas W.; MOTOHASHI, Hozumi. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1169–1203, 2018.

YAN, Bryan P.; TAN, Guang-Ming. What's Old is New Again – A Review of the Current Evidence of Colchicine in Cardiovascular Medicine. **Current Cardiology Reviews**, v. 13, n. 2, 2017.

YANG, Chien-Chung *et al.* <p>Pristimerin Inhibits MMP-9 Expression and Cell Migration Through Attenuating NOX/ROS-Dependent NF-κB Activation in Rat Brain Astrocytes Challenged with LPS</p>. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 13, p. 325–341, 2020.

YANG, Yang *et al.* Therapeutic potential of digitoflavone on diabetic nephropathy: nuclear factor erythroid 2-related factor 2-dependent anti-oxidant and anti-inflammatory effect. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

YANG, Yue *et al.* The Activation of AMPK/NRF2 Pathway in Lung Epithelial Cells Is Involved in the Protective Effects of Kinsenoside on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–14, 2022.

YAO, Huankai *et al.* Flavonoids from *Polypodium hastatum* as neuroprotective agents attenuate cerebral ischemia/reperfusion injury *in vitro* and *in vivo* via activating Nrf2. **Redox Report**, v. 30, n. 1, 2024.

YOON, Jeong-Hyun; YOUN, Kumju; JUN, Mira. Protective effect of sargahydroquinic acid against Aβ25–35-evoked damage via PI3K/Akt mediated Nrf2 antioxidant defense system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112271, 2021.

YOU, Wenting *et al.* A time window for rescuing dying retinal ganglion cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, 31 jan. 2024.

YU, Rong *et al.* MIEF1/2 orchestrate mitochondrial dynamics through direct engagement with both the fission and fusion machineries. **BMC Biology**, v. 19, n. 1, 2021.

ZGORZYNSKA, Emilia; DZIEDZIC, Barbara; WALCZEWSKA, Anna. An Overview of the Nrf2/ARE Pathway and Its Role in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9592, 2021.

ZHANG, Fan-shun *et al.* Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2022a.

ZHANG, Li *et al.* Fucoidan Protects Dopaminergic Neurons by Enhancing the Mitochondrial Function in a Rotenone-induced Rat Model of Parkinson's Disease. **Aging and disease**, v. 9, n. 4, p. 590, 2018.

ZHANG, Linjie *et al.* Troglitazone as a Novel Nrf2 Activator to Attenuate Oxidative Stress and Exert Neuroprotection. **ACS chemical neuroscience**, p. 10.1021/acchemneuro.5c00163, 2025.

ZHANG, Shunrong *et al.* Recombinant High-Mobility Group Box 1 (rHMGB1) Promotes NRF2-Independent Mitochondrial Fusion through CXCR4/PSMB5-Mediated Drp1 Degradation in Endothelial Cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 9993240, 2021.

ZHANG, Shuwen *et al.* A novel in vitro senescent model of intervertebral disc degeneration induced by D-galactose. 14 out. 2022b.

ZHANG, Weiwei; FENG, Cong; JIANG, Hong. Novel target for treating Alzheimer's Diseases: Crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101207, 2021.

ZHANG, Xinyuan *et al.* Nuclear erythroid 2-related factor 2 protects against reactive oxygen species -induced preterm premature rupture of membranes through regulation of mitochondria. **Biology of Reproduction**, v. 109, n. 3, p. 330–339, 2023.

ZHANG, ZEYU *et al.* Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 5, p. 2255–2262, 2014.

ZHAO, Mei-Xia; JI, Liang-Nian; MAO, Zong-Wan. β -Cyclodextrin/glycyrrhizic acid functionalised quantum dots selectively enter hepatic cells and induce apoptosis. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 18, n. 6, p. 1650–1658, 2012.

ZHENG, Xin *et al.* Translational Informatics Driven Drug Repositioning for Neurodegenerative Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 23, 2025.

ZHI, Weiwei *et al.* Melatonin elicits protective effects on OGD/R-insulted H9c2 cells by activating PGC-1 α /Nrf2 signaling. **International Journal of Molecular Medicine**, 2020.

ZHONG, Jianbin *et al.* Effects of Nogo-A Silencing on TNF- α and IL-6 Secretion and TH Downregulation in Lipopolysaccharide-Stimulated PC12 Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–6, 2015.

ZHOU, Huakang *et al.* Colchicine prevents oxidative stress-induced endothelial cell senescence via blocking NF- κ B and MAPKs: implications in vascular diseases. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 20, n. 1, p. 41, 2023.

ZHUANG, Cuicui *et al.* Selenomethionine Suppressed TLR4/NF- κ B Pathway by Activating Selenoprotein S to Alleviate ESBL Escherichia coli-Induced Inflammation in Bovine Mammary Epithelial Cells and Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

ZOROVA, Ljubava D. *et al.* Is the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) correctly assessed? intracellular and intramitochondrial modifications of the $\Delta\Psi$ probe, rhodamine 123. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, 1 jan. 2022.

ZUO, Chengchao *et al.* Nrf2: An all-rounder in depression. **Redox Biology**, v. 58, p. 102522, 2022.