

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

VITOR BASTIANELLO MOSTARDEIRO

EFEITOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NA MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA E PERFIL INFLAMATÓRIO EM CÉLULAS MICROGLIAIS EXPOSTAS
AO LIPOPOLISSACARÍDEO

SANTA MARIA, RS

2021

Vitor Bastianello Mostardeiro

Efeitos do Ácido Clorogênico na modulação da Sinalização Purinérgica e Perfil Inflamatório em Células Microgliais expostas ao Lipopolissacarídeo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Vera Maria Melchior Morsch

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mostardeiro, Vitor Bastianello
Efeitos do Ácido Clorogênico na modulação da
Sinalização Purinérgica e Perfil Inflamatório em Células
Microgliais expostas ao Lipopolissacarídeo / Vitor
Bastianello Mostardeiro.- 2021.
74 p. ; 30 cm

Orientadora: Vera Maria Melchioris Morsch
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2021

1. Doença de Alzheimer 2. Células Microgliais 3.
Neuroinflamação 4. Neurodegeneração 5. Sistema Purinérgico
I. Melchioris Morsch, Vera Maria II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

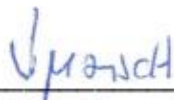
Declaro, VITOR BASTIANELLO MOSTARDEIRO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vitor Bastianello Mostardeiro

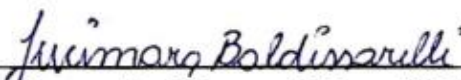
**EFEITOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NA MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO
PURINÉRGICA E PERFIL INFLAMATÓRIO EM CÉLULAS MICROGLIAIS
EXPOSTAS AO LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, na forma de videoconferência, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas**.

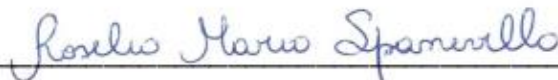
Aprovado em 16 de Setembro de 2021:



Vera Maria Melchior Morsch, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Jucimara Baldissarelli, Dra. (UFPeI)
(titular) – videoconferência



Roselia Maria Spanevello, Dra. (UFPeI)
(titular) – videoconferência

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível graças ao auxílio e dedicação de várias pessoas especiais. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse estudo. De uma maneira especial, gostaria de agradecer:

- À professora Vera Maria Melchior Morsch, minha orientadora, juntamente com a professora Maria Rosa Chitolina, pela oportunidade concedida à mim junto ao laboratório de pesquisa, desde a iniciação científica. Agradeço pela confiança depositada em mim e por sua dedicação em orientar sempre da melhor forma possível. Gostaria de agradecer também ao professor Claudio da Cruz Silveira, meu primeiro orientador, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, logo no meu primeiro ano de graduação, onde recebi conhecimentos práticos inestimáveis sobre o domínio da Química.
- À todos os meus colegas que já passaram pelo laboratório ENZITOX. Vocês são fantásticos. Estou certo de que temos a equipe profissional mais divertida da universidade. Agradeço por todos os ensinamentos e pela companhia ao realizar os experimentos, até mesmo durante a madrugada. De forma especial, gostaria de agradecer ao meu colega Charles Elias Assmann, cientista extremamente talentoso e com o coração mais puro. Obrigado pelas orientações, ensinamentos e por vislumbrar algum potencial naquele estudante de mestrado que resolveu aprender cultivo celular.
- Aos meus pais, Petrônio e Ana, que sempre trabalharam muito, inclusive com vários sacrifícios pessoais, para proporcionar estudo e educação para seus dois filhos. Amo vocês. Gostaria de agradecer também aos meus avós paternos, Vinicius Ferrão Mostardeiro e Eloá Flores Mostardeiro, por todo apoio, ensinamentos e pela companhia nas tardes em que saímos para pescar com o Opala azul nos rios Vacacaí e Jacuí. Agradeço também de forma especial aos meus dindos, Luiz Ozório Barroso (in memoriam) e Maria Helena Bastianello Barroso, que sempre me apoiaram e serviram como exemplo de pessoas singulares, sou extremamente grato à vocês.

- À UFSM, uma universidade pública, gratuita e da mais alta qualidade. À CAPES, FAPERGS, CNPq e ao programa de pós-graduação (PPGBTox), pelo suporte institucional e financeiro concedidos (bolsa – número de processo: 88887.340075/2019-00), desde a iniciação científica até o mestrado. Viva a ciência brasileira!

Enfim, agradeço a todos aqueles que fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento.”

Stephen W. Hawking (1942 – 2018)

RESUMO

Efeitos do ácido clorogênico na modulação da sinalização purinérgica e perfil inflamatório em células microgliais expostas ao lipopolissacarídeo

Autor: Vitor Bastianello Mostardeiro

Orientador: Profa. Dra. Vera Maria Melchior Morsch

A neuroinflamação é um processo associado à várias doenças neurodegenerativas, especialmente as doenças de Parkinson e Alzheimer (DA). No caso do Sistema Nervoso Central, as células da micróglia são importantes macrófagos e a sua ativação está muito relacionada com os processos inflamatórios verificados em doenças neurodegenerativas. O sistema purinérgico também tem relação direta com o processo inflamatório e seus componentes podem estar modulando respostas inflamatórias em células do SNC. O Ácido Clorogênico (CGA) é um produto natural conhecido pela sua atividade antioxidante e anti-inflamatória que seria capaz de modular as respostas do sistema purinérgico, interferindo no processo neuroinflamatório. Dessa forma, buscou-se investigar os possíveis efeitos terapêuticos *in vitro* do ácido clorogênico em um modelo envolvendo o sistema purinérgico e linhagem celular de micróglia (BV-2) exposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (1 ug/mL) e tratamento com uma curva de CGA (0,5 a 300 uM), por 24 e 96 horas. Os resultados demonstram que o CGA consegue modular a atividade de enzimas purinérgicas, restaurando os níveis de hidrólise de ATP aos do controle e aumentando a degradação de Adenosina. O CGA também atuou na expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e A2A, também reduzindo muito a liberação da citocina pró inflamatória IL-1 β . Também foi verificado que esse composto ameniza a migração microglial induzida por LPS em ambos os tempos. Sendo assim, apesar das restrições de protocolos *in vitro*, o presente trabalho evidenciou o potencial terapêutico desse produto natural no possível tratamento de inflamações no SNC.

Palavras-chave (5): Doença de Alzheimer; Células Microgliais; Neuroinflamação; Neurodegeneração; Sistema Purinérgico.

ABSTRACT

Effects of Chlorogenic Acid in modulation of purinergic signalling and inflammatory markers of LPS-exposed microglial cells

Author: Vitor Bastianello Mostardeiro

Advisor: Prof^a Dra. Vera Maria Melchioris Morsch

Neuroinflammation is a process associated with various neurodegenerative diseases, especially Parkinson's and Alzheimer's Disease. In the Central Nervous System (CNS), microglial cells are the most important macrophages and their activation is closely related to the inflammatory process seen in neurodegenerative diseases. The purinergic system also has a very intimate relationship with the inflammatory process and its components might be modulating inflammatory responses in the CNS. Chlorogenic Acid (CGA) is a natural product known for its antioxidant and anti-inflammatory activities that would be able to modulate the responses of the purinergic system, interfering with the neuroinflammatory process. Thus, this study aimed to investigate the possible *in vitro* therapeutic effects of CGA in a model involving the purinergic system and microglial cells (BV-2) exposed to lipopolysaccharide (LPS) (1 ug/mL) and treatment with an increasing concentration effect curve of CGA (0.5 to 300 uM), for 24 and 96 hours. Results show that CGA is able to modulate purinergic activity by restoring ATP hydrolysis levels to those of the control, and increasing the Adenosine breakdown. CGA also acted on the expression of purinergic receptors P2X7 and A2A, and greatly reducing the releases of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . It was also verified that this compound reduced the ratio of migrated cells after LPS challenge at both times. Therefore, despite the restrictions of *in vitro* protocols, this work highlights the therapeutic potential of this natural product in the possible treatment of inflammation in the CNS.

Keywords (5): Alzheimer's disease; Microglial Cells; Neuroinflammation; Neurodegeneration; Purinergic System.

LISTA DE ABREVIações

5'-NT	Enzima 5'-Nucleotidase
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CGA	Ácido Clorogênico
DA	Doença de Alzheimer
ER	Espécies Reativas Totais
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon <i>gama</i>
IL-1 β	Interleucina 1- <i>beta</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
NF- $\kappa\beta$	Fator Nuclear <i>capa-beta</i>
NIA	<i>National Institute on Aging</i>
NTPDase	Enzima CD39
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
RRP	Receptor de Reconhecimento de Padrões
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral <i>alfa</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico da expectativa de vida dos brasileiros ao nascer – 1940/2018.....	13
Figura 2 – Porcentagem da população brasileira em grupos por idade – 1970/2010.....	14
Figura 3 – Representação esquemática do cérebro humano afetado pela DA.....	15
Figura 4 – Representação básica da histologia da DA.....	15
Figura 5 – Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer.....	18
Figura 6 – Resposta microglial à presença de placas β -Amilóides.....	19
Figura 7 – Mecanismo proposto para o envolvimento do estresse oxidativo na neuroinflamação e morte neuronal.....	21
Figura 8 – Elementos da Sinalização Purinérgica.....	22
Figura 9 – Envolvimento da sinalização purinérgica em processos inflamatórios no SNC.....	24
Figura 10 – Estruturas químicas do Ácido Cafeico (a), Ácido Clorogênico (b) e do Ácido Quínico (c).....	25
Figura 11 – Mecanismo de ação anti-inflamatório proposto para os ácidos cafeico e clorogênico, através da via de sinalização promovida pelo NF- κ B.....	26

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Aspectos Gerais.....	13
1.2. A Doença de Alzheimer.....	14
1.3. Diagnóstico e Tratamento.....	16
1.4. Progressão da Doença: hipóteses.....	16
1.5. Neuroinflamação.....	18
1.5.1. Neuroinflamação e Extresse Oxidativo.....	20
1.6. O Sistema Purinérgico.....	21
1.7. Produtos Naturais e Novas Perspectivas.....	24
2. Objetivos.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. Resultados.....	29
3.1. Manuscrito.....	29
4. Conclusão.....	66
5. Referências Bibliográficas.....	67

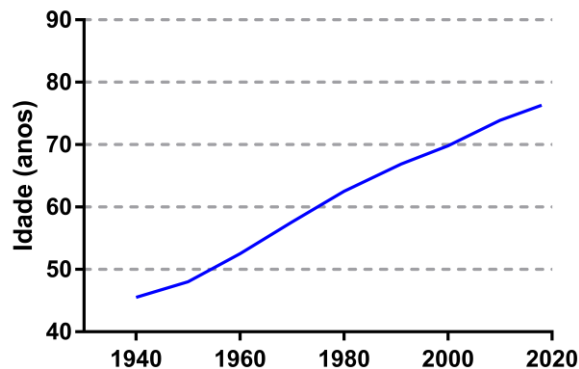
1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Durante o curso da história o conceito de saúde tem se modificado entre as épocas. Conceitos antigos definem saúde como a habilidade do corpo em funcionar. A saúde era vista como um estado normal que poderia ser interrompido a qualquer momento por uma doença (STOKES et al., 1982). Outras definições, como a da Organização Mundial da Saúde (OMS), possuem um conceito mais abrangente, que relacionam a saúde física, mental e o bem estar social dos indivíduos, e não apenas a existência ou não de uma doença (OMS, 1958).

Todas as melhorias implementadas nos sistemas de saúde e novas tecnologias de diagnóstico descobertas no século passado contribuíram para o aumento da expectativa e da qualidade de vida da população. Dados coletados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostram que a expectativa de vida média de um brasileiro nascido em 1960 era de apenas 53 anos. Dados mais recentes indicam uma expectativa média de 76 anos em 2018 (figura 1) (IBGE, 2018).

Figura 1 – Gráfico da expectativa de vida dos brasileiros ao nascer – 1940/2018.

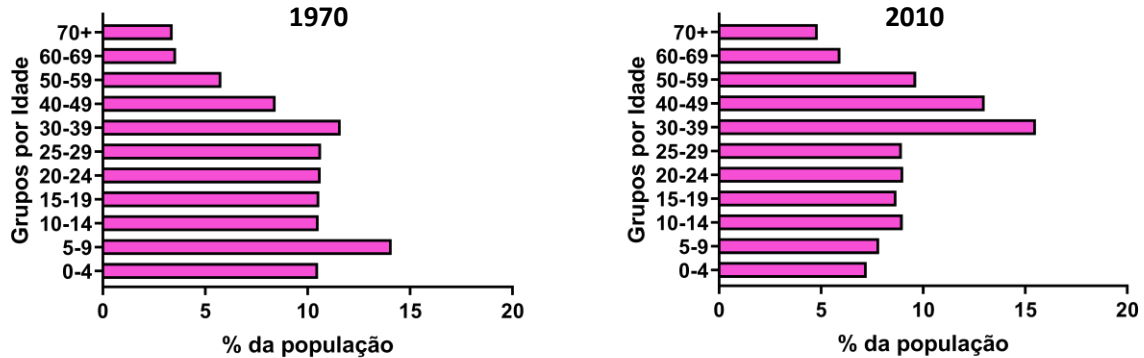


Fonte: adaptado de IBGE, 2018.

Esse aumento significativo na expectativa de vida levou à um aumento substancial dos grupos mais velhos da população (figura 2) (SIMÕES, 2016). Ao passo em que essa evolução, de certa forma, aumentou a qualidade de vida das pessoas em geral, ela também causou um aumento importante nos índices de ocorrência de doenças que

afetam principalmente a parcela idosa, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, por exemplo (NIA, 2021).

Figura 2 – Porcentagem da população brasileira em grupos por idade – 1970/2010.



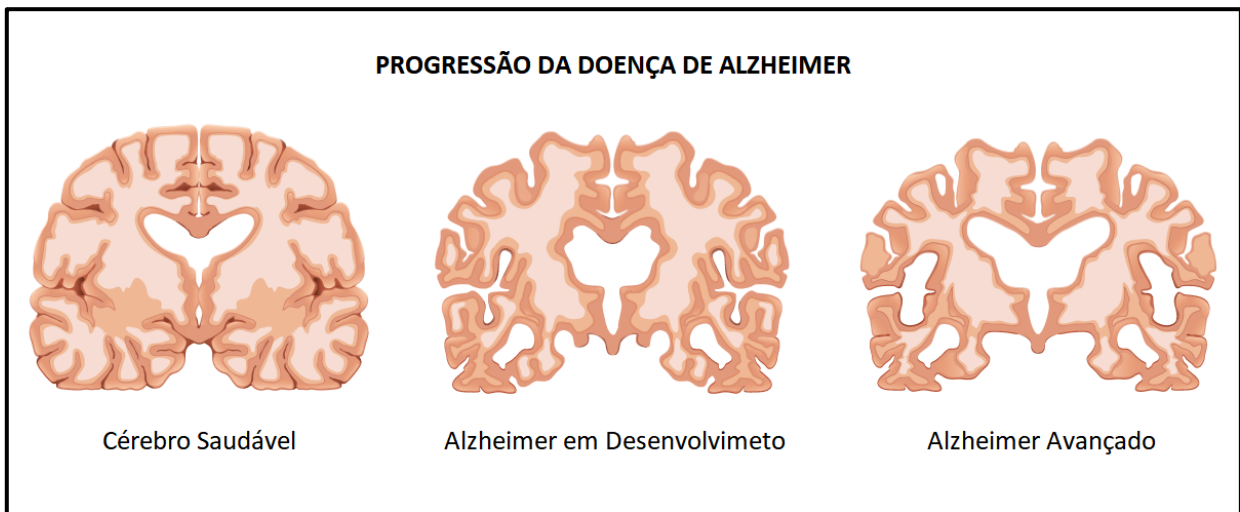
Fonte: adaptado de SIMÕES, 2016.

1.2. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que atinge principalmente a população idosa, com mais de 60 anos. Como a expectativa de vida da população em geral tende a crescer no futuro próximo, o número de casos também deve aumentar substancialmente nos próximos anos, caracterizando a DA como um potencial grande problema de saúde pública do século XXI (SCHELTENS et al., 2016). Há estimativas de que até 2050 o número de acometidos por essa condição poderá chegar a mais de 1 bilhão de pessoas, cerca de 22% da população mundial. As estimativas também indicam que 79% dos acometidos viverão em países subdesenvolvidos, onde as alternativas de diagnóstico e tratamento ainda são muito restritas (PRINCE et al., 2013).

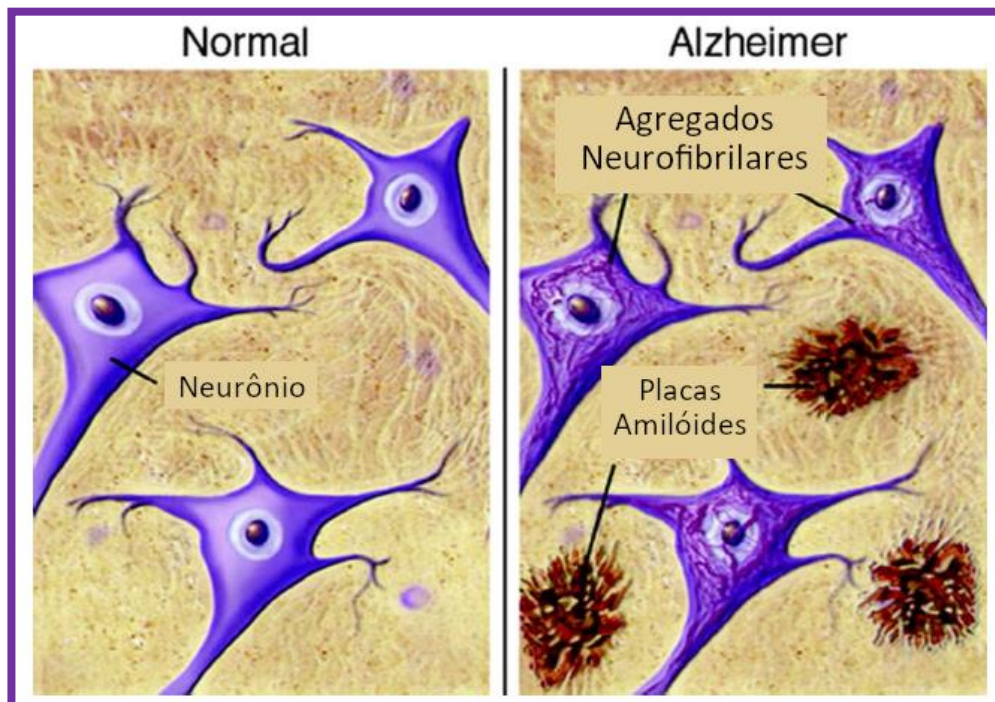
Pacientes com estágios avançados da DA apresentam alterações graves na estrutura fundamental do cérebro levando a sintomas como a perda progressiva da memória e de muitas funções cognitivas (BALLARD et al., 2011). Uma das alterações estruturais verificadas na DA é o acúmulo de placas da proteína β -amiloide além da presença de um grande número de agregados neurofibrilares no cérebro (HAMLEY, 2012). Também é verificado morte neuronal e redução no volume cerebral (figuras 3 e 4) (RONDEAU et al., 2000).

Figura 3 – Representação esquemática do cérebro humano afetado pela DA. No Alzheimer avançado é verificado a redução do volume encefálico devido à morte neuronal.



Fonte: adaptado de NIA, 2021.

Figura 4 – Representação básica da histologia da DA. A presença de agregados neurofibrilares nos neurônios e de placas da proteína β -amilóide no cérebro são os principais componentes da histologia da DA.



Fonte: adaptado de MCGIRR et al., 2020.

1.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Alzheimer é a maior causa de demência em adultos, por ser uma doença de evolução gradativa o diagnóstico nem sempre ocorre nos estágios iniciais (NIA, 2021). Os primeiros sintomas da DA podem variar em cada paciente, mas tipicamente são os problemas de memória que revelam sinais de deficiência cognitiva. Dificuldade de movimentos e com a identificação de odores também podem ser sinais da progressão da DA (SCHELTENS et al., 2016).

Por se tratar de uma doença complexa, é improvável que um único medicamento ou intervenção consiga tratar todos os acometidos pela doença. Atualmente não há cura para a Doença de Alzheimer. Os tratamentos mais avançados disponíveis atualmente se baseiam em uma combinação de fármacos que atuam tanto no retardo do curso da doença mas como também no tratamento aos sintomas (BREIJYEH; KARAMAN, 2020; CUMMINGS et al., 2019).

As drogas que visam modificar a progressão da doença têm como alvo a cascata de sinalização amilóide e a formação dos agregados. Essas drogas, no geral, funcionam como inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e agonistas de receptores de glutamato, além da função anti-inflamatória. Já o tratamento sintomático busca atuar nos problemas cognitivos, agitação e evitando convulsões (CUMMINGS et al., 2019).

Em 2021 a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do medicamento Aducanumab para o tratamento da DA em casos leves, sendo a única nova droga aprovada para o tratamento dessa doença em quase 20 anos. Esse novo fármaco é um anticorpo monoclonal que atua na imunização dos peptídeos amilóides, dificultando a formação dos depósitos e placas. Todavia, essa aprovação se deu por meio de uma rota acelerada e causou bastante controvérsia ao considerar os possíveis efeitos colaterais do tratamento (MULLARD, 2021).

1.4. PROGRESSÃO DA DOENÇA: HIPÓTESES

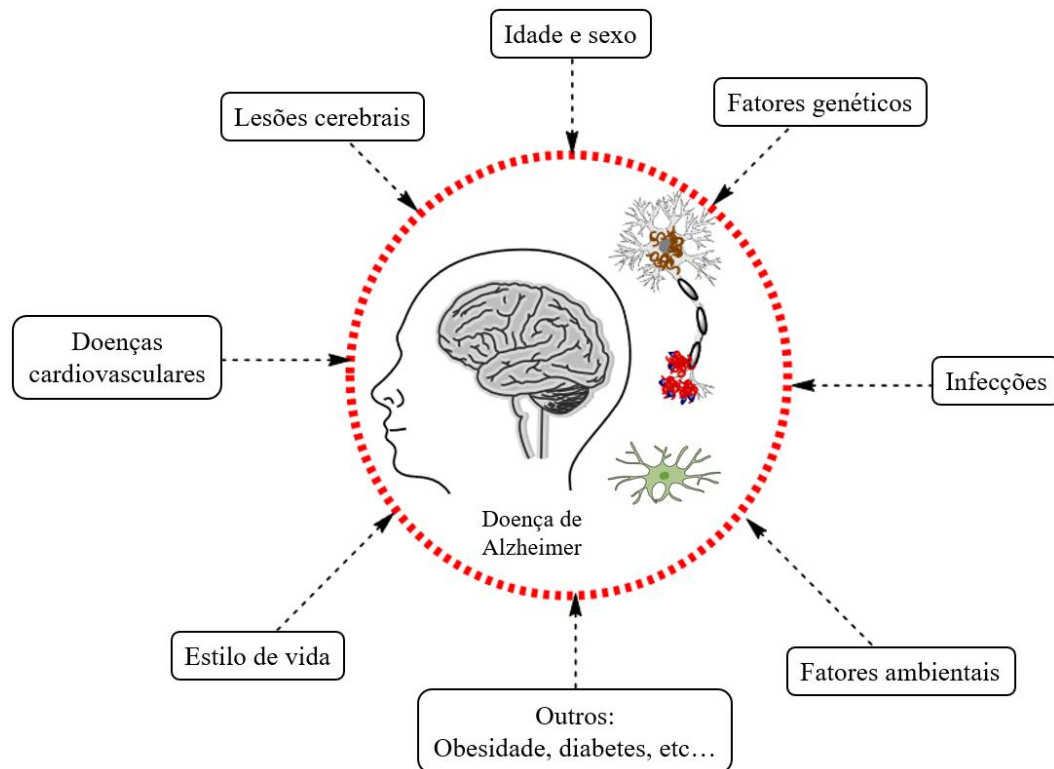
Em uma tentativa de explicar os mecanismos bioquímicos envolvidos na DA, algumas hipóteses foram formuladas. Uma das mais estudadas é a hipótese colinérgica (BARTUS et al., 1982), uma vez que um declínio na função colinérgica do Sistema Nervoso Central (SNC) contribui de forma significativa para a queda cognitiva associada

à idade avançada e à DA. (BARTUS, 2000). Além disso, o sistema colinérgico também mostrou ter papel fundamental nos processos de memória e aprendizagem (TERRY; BUCCAFUSCO, 2003).

No entanto, outras hipóteses para a progressão da DA também têm ganhado relevância em pesquisas realizadas nos últimos anos, como é o caso da hipótese metálica, proposta baseada em dados da literatura que mostraram concentrações de alumínio de 2 a 3 vezes maiores no cérebro de pacientes com Alzheimer em comparação com indivíduos saudáveis. O alumínio é um dos fatores ambientais que vem sendo associado com um maior risco para o desenvolvimento da DA (BAKAR et al., 2010; GUPTA et al., 2005; MCLACHLAN et al., 2019).

Atualmente, a DA é considerada uma doença multifatorial, uma vez que pode haver o envolvimento de fatores genéticos, alimentares e ambientais (figura 5) (MARTIN; DELARASSE, 2018). Evidências têm sugerido que a DA não se restringe apenas a neurodegeneração em si, mas incluiria também interações com mecanismos imunológicos no SNC. Proteínas malformadas e agregados proteicos ligam-se a receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) em células da micróglia e astrócitos e desencadeiam respostas imunes inatas caracterizadas pela liberação de mediadores inflamatórios, que contribuem para a progressão e severidade da doença (figura 6) (HENEKA et al., 2015).

Figura 5 – Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer.



Fonte: adaptado de BREIJYEH, KARAMAN, 2020.

1.5. NEUROINFLAMAÇÃO

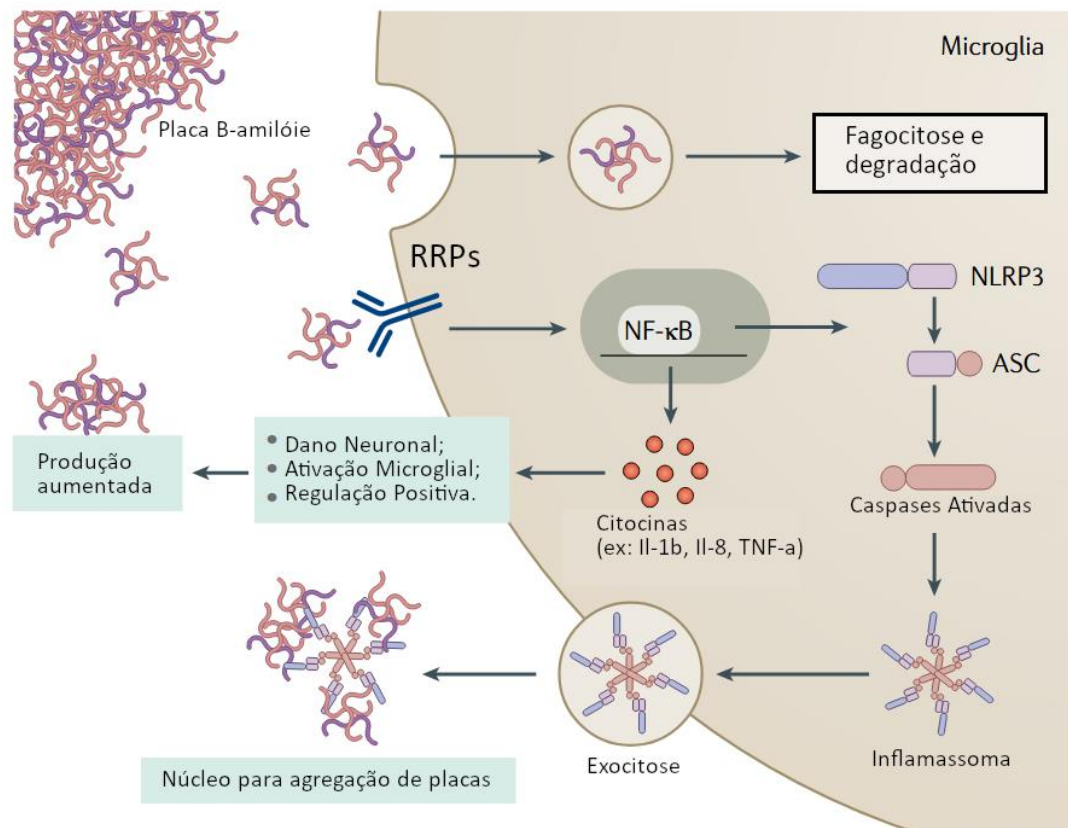
No caso do SNC, já se reconhece que as células da micróglia são as principais células imunes presentes neste tecido, exercendo um importante papel na defesa contra organismos invasores, juntamente com os astrócitos, que também são células efetoras do SNC. Entretanto, de maneira geral, as células da micróglia atuam fundamentalmente mantendo a homeostase tecidual no SNC por meio da eliminação de patógenos, de proteínas malformadas e controlando os níveis de inflamação (EKDAHL et al., 2009; GRAEBER et al., 2011; STREIT et al., 2004).

As células da micróglia são os macrófagos mais importantes do SNC e são células extremamente dinâmicas, plásticas, que podem existir em vários fenótipos funcionalmente diferentes (PERRY et al., 2010). Esses diferentes fenótipos não são necessariamente aparentes em termos de morfologia, mas podem alterar a resposta dessas células frente à ativação. A ativação microglial é um fenômeno participante de

várias condições no SNC, incluindo doenças neurodegenerativas (LENG, EDISON, 2021; PERRY et al., 2010).

Durante o processo de inflamação, as células da micróglia são ativadas e ocorre a liberação de fatores pró-inflamatórios (tais como o Fator de Necrose Tumoral Alpha [TNF- α], Interleucina 1 Beta [IL-1 β] e Interleucina 8 [IL-8]) que contribuem ainda mais para a ativação microglial, criando uma retroalimentação positiva (figura 6) (CHENG et al., 2018; LENG; EDISON, 2021). Alguns medicamentos, como a Minociclina, são utilizados como neuroprotetores e auxiliam nessa condição, porém, com muitos efeitos colaterais (KIM, SUH, 2009).

Figura 6 – Resposta microglial à presença de placas β -Amilóides. As placas amiloides podem ser reconhecidas por uma gama de RRP's na micróglia, o que desencadeia a liberação de citocinas e caspases pela via do NF- κ B, criando uma regulação positiva que aumenta o dano neuronal, a ativação microglial e a produção de placa amiloide.



Fonte: adaptado de LENG, EDISON, 2020.

Nesse sentido, vários estudos têm demonstrado que processos inflamatórios e imunes que ocorrem no (SNC) estão envolvidos na progressão da DA, sugerindo que as células gliais, como os astrócitos e as células da micróglia, são ativadas em torno das lesões provocadas pelos peptídeos β -amiloides e produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (DOMINGUES et al., 2017; MARTIN; DELARASSE, 2018). Essa ativação microglial também já foi observada em modelos animais da DA, especialmente no estágio de formação das placas amilóides (HANZEL et al., 2014). Inicialmente, acreditava-se que a ativação microglial era consequência dessas lesões. Entretanto, evidências recentes indicam que as células microgliais têm um envolvimento fundamental nos estágios iniciais e na progressão da DA, o que as tornam um importante potencial alvo terapêutico (HEMONNOT et al., 2019).

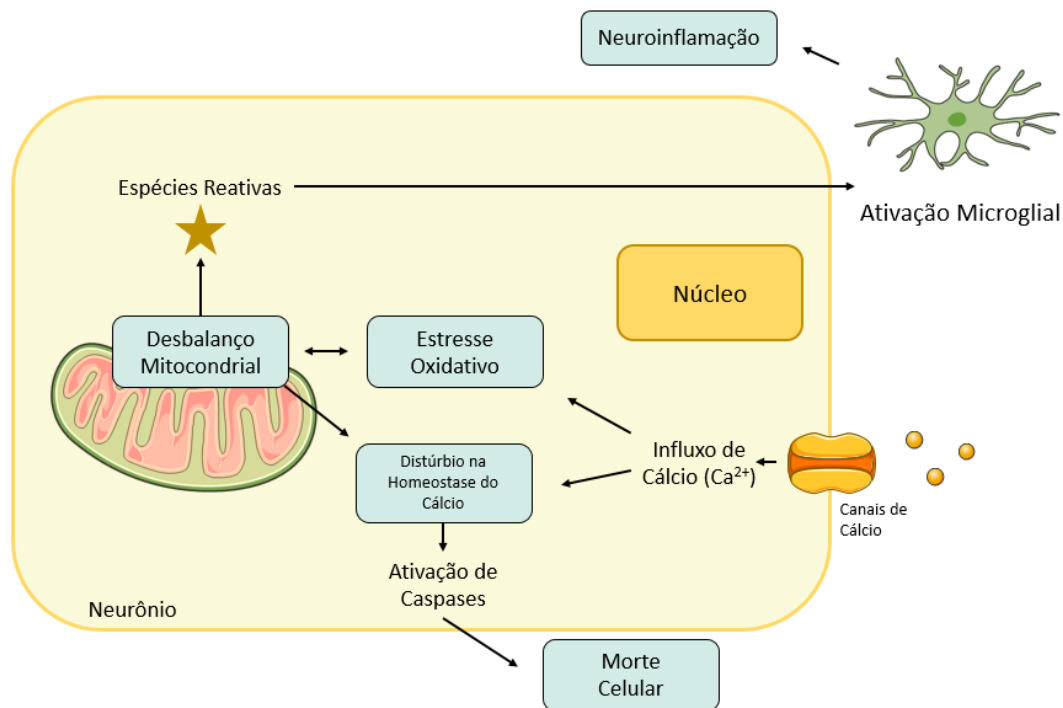
1.5.1. Neuroinflamação e Estresse Oxidativo.

Os processos (neuro)inflamatórios também estão estreitamente relacionados com o estresse oxidativo (figura 7). As espécies reativas são um subproduto fisiológico do metabolismo e podem ser geradas a partir do oxigênio (ERO) e também do nitrogênio (ERN). Em situações normais, as defesas antioxidantes do corpo agem sobre as espécies reativas para manter o equilíbrio. O estresse oxidativo se dá quando há um desbalanço entre as defesas antioxidantes e as espécies reativas (BARNHAM et al., 2004). Pesquisas têm demonstrado que, em algumas regiões do hipocampo, o acúmulo do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) afeta proteínas relacionadas com potenciação de longa duração, um dos mais importantes mecanismos celulares para memória e aprendizagem (LI et al., 2013). Pacientes com diagnóstico positivo para DA também apresentam alterações importantes em biomarcadores associados com as defesas antioxidantes (NIEDZIELSKA et al., 2016).

No SNC, o desbalanço entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes leva a célula a um estado de estresse oxidativo. É proposto que esse estado altera a homeostase da concentração de cálcio no meio intracelular levando à ativação de caspases e morte neuronal. As espécies reativas em excesso também contribuem para a ativação microglial que colabora com o estado de neuroinflamação (figura 7) (POEWE et al., 2017).

No caso das micróglia, a sua ativação libera uma grande variedade de mediadores inflamatórios, incluindo as espécies reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN). Estudos também demonstram que o estresse oxidativo nas micróglia desempenha um papel central na etiologia das doenças de Parkinson e Alzheimer, e que terapias anti-inflamatórias tiveram papel neuroprotetivo nesse tipo de células (PETERSON, FLOOD, 2012; QIAN et al., 2007).

Figura 7 – Mecanismo proposto para o envolvimento do estresse oxidativo na neuroinflamação e morte neuronal.



Fonte: adaptado de POEWE et al., 2017.

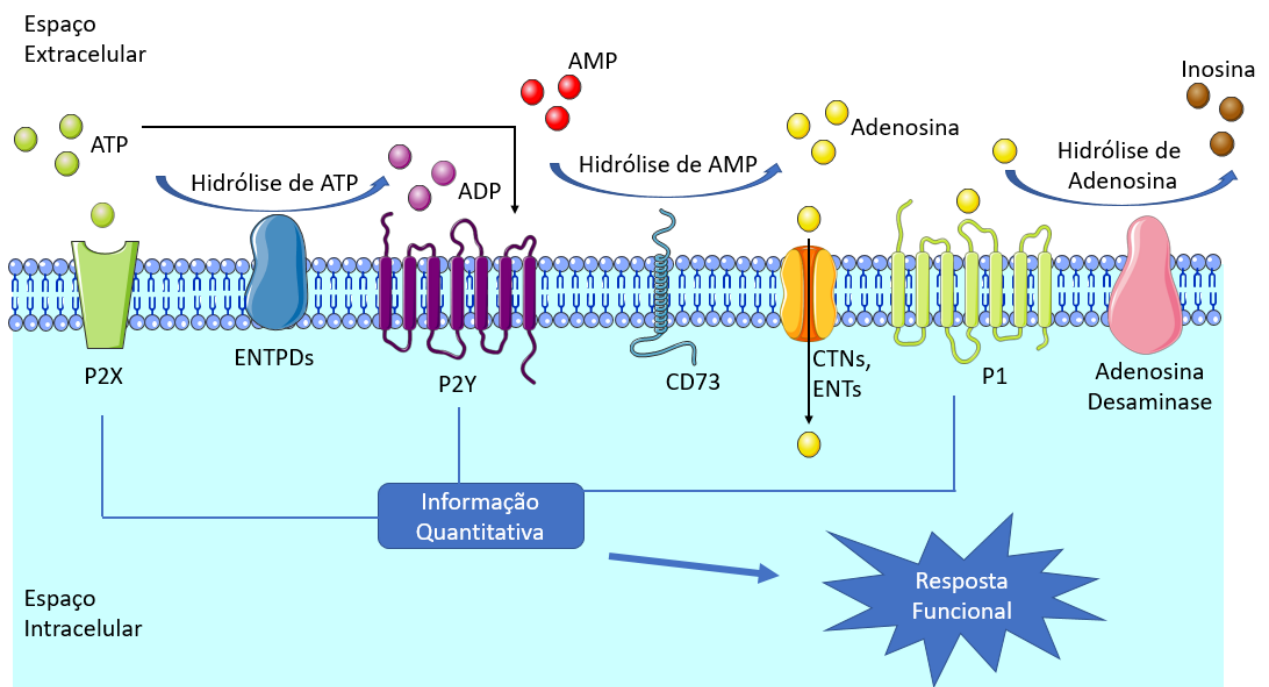
1.6. O SISTEMA PURINÉRGICO

Considerando os processos inflamatórios presentes na progressão da doença, também há uma possível relação do sistema purinérgico com a DA, já que este se relaciona intimamente com o sistema imune (MARTIN et al., 2019). O sistema purinérgico (figura 8) é um conjunto de receptores e enzimas relacionadas com a hidrólise de nucleosídeos e nucleotídeos, entre eles o ATP, que é uma molécula energética de enorme importância para a célula e devido à sua natureza polarizada não consegue

atravessar membranas simplesmente por difusão (CALOVI et al., 2019). Sendo assim, a sua presença no espaço extracelular ativa receptores do tipo P2X, e em menor extensão receptores P2Y, e desencadeia uma cascata de sinalização capaz de modular respostas inflamatórias (JUNGER, 2011). Além do ATP outras moléculas também estão envolvidas nessa sinalização. A adenosina, subproduto principal da degradação do ATP, também é descrita como um importante sinalizador (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Em mamíferos, são conhecidos quatro receptores do tipo P1, oito do tipo P2Y e sete do tipo P2X. Já foi descoberto que a sinalização purinérgica promove a migração das células imunes – tais como as células da micróglia – para o núcleo da inflamação através de um efeito quimiotático (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

As células do SNC expressam, entre outros, alguns dos tipos conhecidos de receptores do tipo P2X, que são canais de cátions controlados por ligantes. Esses canais são permeáveis ao íons de Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e Cálcio (Ca^{2+}), com a ligação do ATP (ABBRACCHIO et al., 2009). Estudos já determinaram a regulação positiva desses receptores em locais de neurodegeneração (VISCOMI et al., 2004), lesões traumáticas no cérebro (ZHANG et al., 2006) e nas micróglia da medula espinhal após lesões no sistema periférico (TSUDA et al., 2003; ULMANN et al., 2008).

Figura 8 – Elementos da Sinalização Purinérgica.



Fonte: adaptado de JUNGER, 2011.

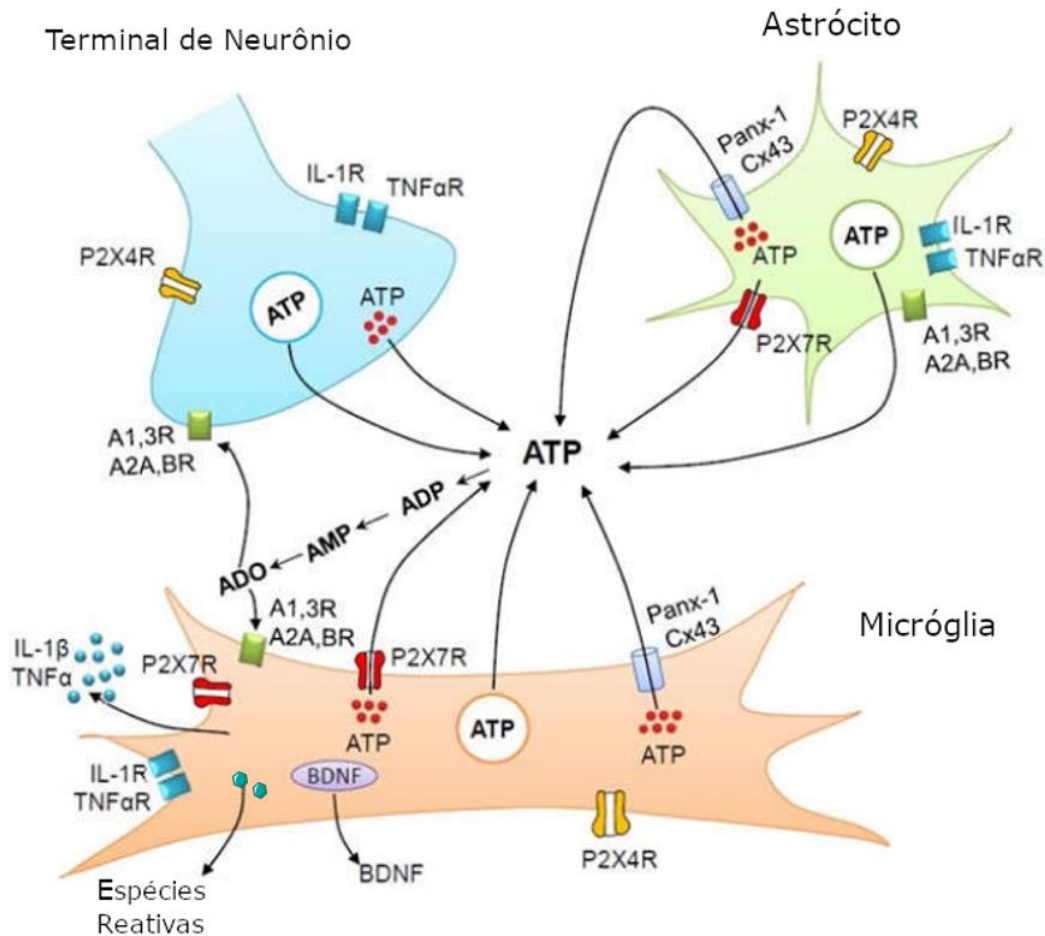
Todos os subtipos conhecidos de receptores do tipo P2Y são expressos por células do SNC, com bastante variação entre os tipos celulares (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Esses receptores também são ativados em condições patológicas e participam da neuroinflamação de formas muito variadas, onde geralmente a ativação de receptores P2Y está associada a neuroproteção, especialmente na DA, atuando sobre diversas vias (BEAMER et al., 2016).

Além dos receptores, dados da literatura indicam que a adenosina em si também atua em processos inflamatórios, sendo mais evidente em momentos mais tardios da inflamação como forma de modular a resposta inflamatória, permanecendo menos ativa nos estágios iniciais (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Especialmente no sistema imune esse nucleotídeo é conhecido por sua capacidade anti-inflamatória, pois regula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e também tem papel importante na maturação e diferenciação de macrófagos e células dendríticas (ANTONIOLI et al., 2013).

Também é conhecido que o sistema purinérgico, especialmente em células da micróglia, participa de forma importante em processos de neuroinflamação (figura 9). No SNC a sinalização purinérgica envolve as células da micróglia, astrócitos e neurônios em um sistema de regulação que envolve toda a homeostase tecidual (ILLES et al., 2020).

Todas as células do SNC expressam algum tipo de receptor purinérgico, a liberação de ATP no meio extra celular pode se dar tanto através dos canais panexina (Panx-1 – Cx43) mas também através da exocitose por vesículas. A ativação de receptores do tipo P2X4 induz a liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), bem como a produção de vesículas contendo a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ainda, a ativação dos receptores P2X7 induz a difusão de espécies reativas pela membrana plasmática. Todos esses subprodutos microgliais causam neuroinflamação e neurodegeneração (figura 9) (HEMONNOT et al., 2019; ILLES et al., 2020).

Figura 9 – Envolvimento da sinalização purinérgica em processos inflamatórios no SNC.



Fonte: adaptado de ILLES et al., 2020.

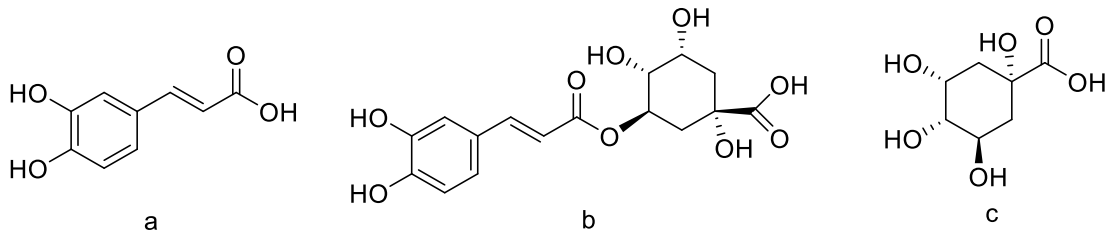
1.7. PRODUTOS NATURAIS E NOVAS PERSPECTIVAS

A relação entre os processos inflamatórios e a DA, através do sistema purinérgico, estimula a busca de novos compostos que possuam atividade anti-inflamatória. Antioxidantes naturais encontrados em plantas têm mostrado promissores efeitos anti-inflamatórios e parecem representar uma importante oportunidade para o desenvolvimento de novas classes terapêuticas (HEITMAN, INGRAM, 2017; STEFANELLO et al., 2019).

Um desses compostos é o ácido clorogênico (CGA), derivado do ácido cafeico (figura 10), que é um produto natural encontrado em quantidades consideráveis no café, frutas cítricas, maçã, pera, tomate e até mesmo na erva-mate, produto amplamente consumido no sul do Brasil. Estudos têm demonstrado sua atividade antioxidante

(BONARSKA-KUJAWA et al., 2015), neuroprotetora (KWON et al., 2010) e uma promissora atividade anti-inflamatória (ZHANG et al., 2010). Muitos dos efeitos terapêuticos do ácido clorogênico estão relacionados, por exemplo, ao consumo do café, já que este composto é fortemente encontrado nessa bebida. No café também estão presentes outros compostos fenólicos, isômeros e derivados do ácido clorogênico, que são comumente designados de ácidos clorogênicos. Esses compostos fenólicos representam de 5 a 10 por cento da massa dos grãos de café, um percentual de fato muito maior do que o da própria cafeína (1 a 2%) (TOMAC et al., 2020). Outros estudos demonstram que os compostos ativos presentes nessa bebida possuem efeitos fisiológicos, tais como potenciais benefícios cardiovasculares, atividade antioxidante e na proteção do SNC (BONITA et al., 2007; DEL CASTILLO et al., 2002; MIKAMI; YAMAZAWA, 2015)

Figura 10 – Estruturas químicas do Ácido Cafeico (a), Ácido Clorogênico (b) e do Ácido Quínico (c).



Fonte: elaborado pelo autor.

Embora tenham atividades biológicas relativamente similares, as propriedades químicas dos ácidos clorogênico e cafeico são distintas, em função de suas diferentes estruturas. O ácido clorogênico, pela agregação de um grupo derivado do ácido quínico (figura 10), é muito mais hidrossolúvel do que o ácido cafeico (HABTEMARIAM, 2016).

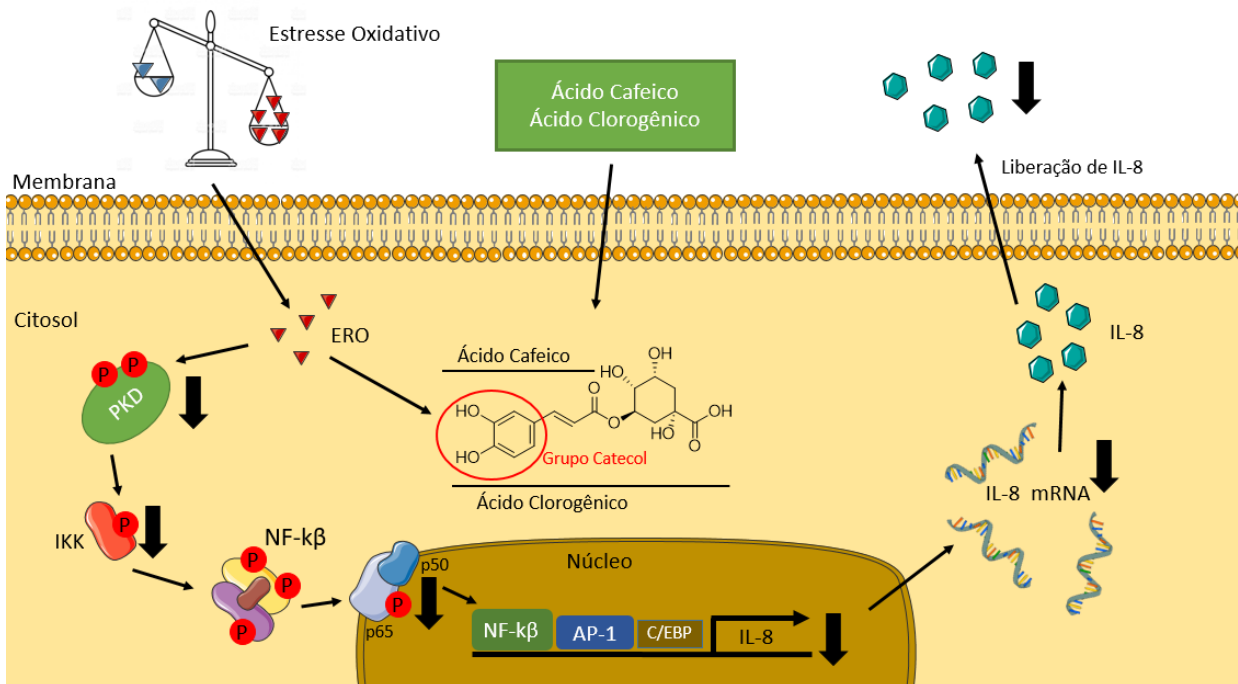
Tendo em vista o seu potencial anti-inflamatório, é possível que esse composto atue sobre as células do sistema imune. Dados da literatura indicam que o ácido clorogênico promove a inibição da via sinalizadora NF- κ B, relacionada com o processo inflamatório, além de atuar na modulação de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (Bao et al., 2018). Outros estudos também sugerem que compostos fenólicos, como os ácidos cafeico, clorogênico e ferrúlico, agem principalmente sobre vias do sistema

purinérgico (figura 8), que é intimamente relacionado com os processos inflamatórios (OBOH et al., 2018; SALAU et al., 2020).

Um estudo prévio feito por Oboh et al. (2018) revelou que um extrato natural contendo várias moléculas, entre elas, uma significativa concentração de ácido clorogênico, foi capaz de inibir a atividade de enzimas purinérgicas e colinérgicas, além de prevenir dano oxidativo no cérebro de ratos, o que sugere que alguns compostos fenólicos tem um potencial papel terapêutico em algumas doenças neurodegenerativas. O ácido ferrúlico, que possui estrutura química similar ao ácido clorogênico, também mostrou ter a capacidade de modular a atividade purinérgica (SALAU et al., 2020).

Um dos principais mecanismos de ação do ácido clorogênico propostos até o momento envolve a sua alta capacidade química de neutralizar radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), por exemplo (SANTANA-GÁLVEZ et al., 2017). É proposto que a redução nos níveis de ERO pelos ácidos clorogênico e cafeico consegue balancear o estresse oxidativo, que por sua vez reduz a ativação da via NF- κ B, responsável pela liberação de interleucinas pró-inflamatórias (figura 11) (NAVEED et al., 2018).

Figura 11 – Mecanismo de ação anti-inflamatório proposto para os ácidos cafeico e clorogênico, através da via de sinalização promovida pelo NF- κ B.



Fonte: adaptado de NAVEED et al., 2018.

O CGA também já mostrou efeitos em células microgliais, em estudos prévios, atenuando a ativação microglial e melhorando a sobrevivência de neurônios (SHEN et al., 2012). Nesse cenário de neuroinflamação existem alguns protocolos para o seu estudo de forma *in vitro*. Um desses protocolos inclui o uso do lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina extraída de bactérias gram-negativas, e é especialmente interessante no caso de células microgliais pois além de induzir a neuroinflamação propõe-se também que esse composto causa ativação microglial (NAM et al., 2018; QIN et al., 2007). O LPS é conhecido por se ligar à receptores Toll-Like Receptors (TLRs), em especial o TLR4, expressos na superfície de células microgliais, causando a ativação de cascatas de sinalização que também incluem o fator de transcrição NF- κ B, culminando na liberação de moléculas pró-inflamatórias (LU et al., 2008).

Portanto, o sistema purinérgico está intimamente relacionado ao processo inflamatório nas células e estudos demonstram o caráter inflamatório da condição que afeta as células no SNC ao longo do desenvolvimento da DA. Os produtos naturais também são um alvo terapêutico importante para o desenvolvimento de novas classes de medicamentos. Sendo assim, ainda carecem estudos que envolvam uma abordagem purinérgica no tratamento de inflamações em células do SNC, o que pode resultar em novas descobertas sobre possíveis tratamentos para a DA, uma doença cada vez mais comum e que afeta uma parcela significativa da população idosa, sem alternativas reais de cura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do ácido clorogênico, em uma abordagem envolvendo o sistema purinérgico, em um modelo experimental *in vitro* utilizando linhagens celulares de micróglia (BV-2), expostas ao lipopolissacarídeo (LPS).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em células microgлияis (BV-2, linhagem comercial) expostas a diferentes concentrações de ácido clorogênico e ao LPS, avaliar:

- A morfologia, viabilidade e migração celulares;
- A atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA;
- A quantificação proteica dos receptores purinérgicos P2X7, A1 e A2A;
- Os níveis celulares de marcadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ ;
- Os indicadores de estresse oxidativo: peroxidação lipídica (TBARS), ânion superóxido (O₂⁻) e óxido nítrico (ON).

3. RESULTADOS

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados sobre forma de um manuscrito a seguir. Os itens “Materiais e Métodos”, “Resultados” e “Discussão” encontram-se descritos no próprio manuscrito.

3.1. MANUSCRITO

Manuscrito está submetido na revista **Food Chemistry**.

Fator de impacto 6,306 (2019) – Qualis A2 (área CBII).

Título: *Chlorogenic acid anti-neuroinflammatory effect modulated by purinergic signaling in LPS-challenged mouse brain microglial cells*

Chlorogenic acid anti-neuroinflammatory effect modulated by purinergic signaling in LPS-challenged mouse brain microglial cells

Vitor Bastianello Mostardeiro^{1,#}, Charles Elias Assmann^{1,#}, Grazielle Castagna Cezimbra Weis², Vanessa Valéria Miron¹, Milagros Fanny Vera Castro¹, Taís Vidal Palma¹, Cinthia Melazzo de Andrade¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{3,4}, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Vera Maria Melchiors Morsch^{1,*}

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Postgraduate Program in Physiology and Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Postgraduate Program in Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

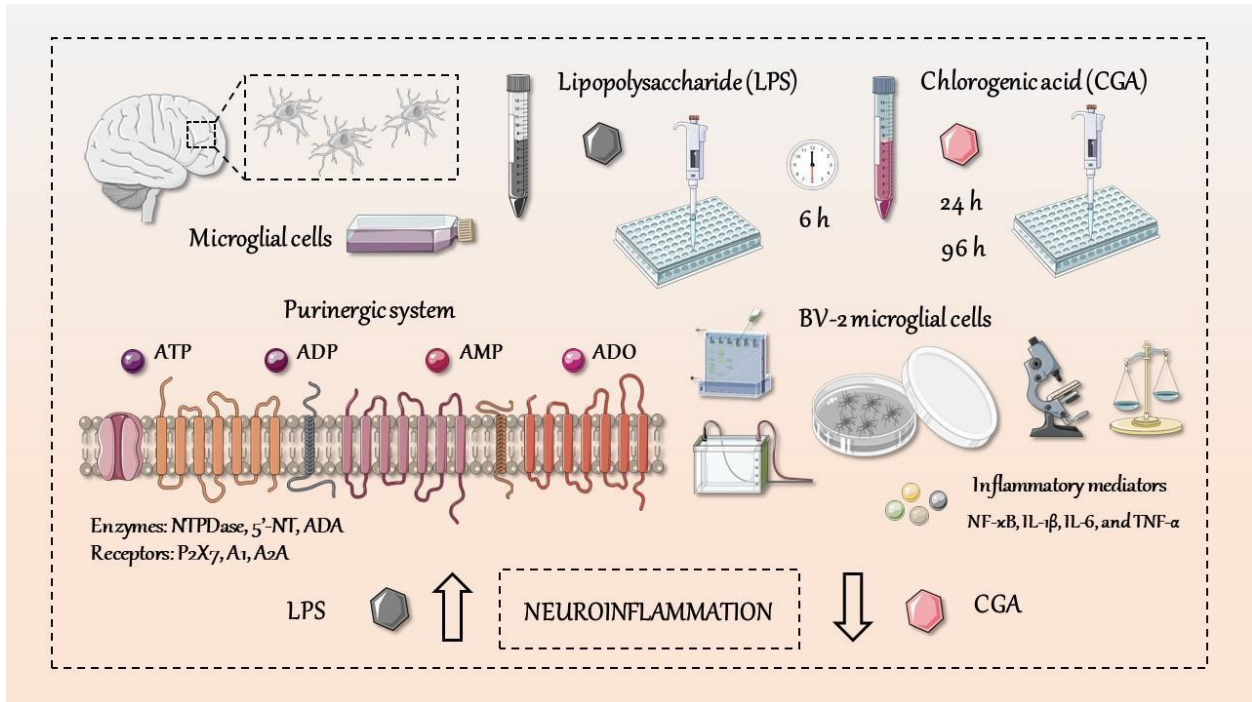
* Corresponding author: veramorsch@gmail.com (V.M.M.M.). Postgraduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

The first two authors contributed equally to this research and share the first authorship.

Running title:

Purinergic signaling regulates chlorogenic acid anti-neuroinflammatory effect

Graphical abstract



Highlights

- Chlorogenic acid (CGA) modulates purinergic parameters in a neuroinflammation model
- CGA mitigates neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 microglial cells
- CGA attenuates migration elicited by LPS in BV-2 cells

Abstract: (up to 250 words) purpose of the research, the principal results and major conclusions

Rationale: Chlorogenic acid (CGA) has several biological activities, however, its potential modulatory effect in neuroinflammation and the implication of the purinergic system in this context have not been fully addressed.

Purpose: The possible anti-inflammatory action of CGA in lipopolysaccharide (LPS)-activated BV-2 microglial cells and the involvement of purinergic components in this process have been investigated.

Results: CGA attenuated microglial migration and release of pro-inflammatory cytokine IL-1 β triggered by LPS. Moreover, this phenolic acid modulated purinergic enzyme activities, restoring ATP hydrolysis levels, and regulated protein levels of purinoceptors P2X7 and A2A.

Conclusions: This study underlines the potential anti-neuroinflammatory effects of CGA, supporting the further use of this compound in the management of neuroinflammatory responses linked to neurodegenerative morbidities.

Keywords (6): Neuroinflammation; BV-2 cells; Cytokines; Purinoceptors; Lipopolysaccharide; Phenolic acid.

Abbreviations: 5'-NT: 5'-Nucleotidase; A1R: Adenosine A1 receptor; A2AR: Adenosine A2A receptor; AD: Alzheimer's disease; ADA: Adenosine deaminase; ADO: Adenosine; ADP: Adenosine diphosphate; AMP: Adenosine monophosphate; ANOVA: Analysis of variance; ATP: Adenosine triphosphate; CGA: Chlorogenic acid; CNS: Central nervous system; FBS: Fetal bovine serum; LPS: Lipopolysaccharide; NTPDase: Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; P1: Adenosine receptors; P2: ATP/ADP receptors; RIPA: Radioimmunoprecipitation assay; RNS: Reactive nitrogen species; TBST: Tris-buffered saline with Tween

1. Introduction

Alzheimer's and Parkinson's disease are among the most prevalent neurodegenerative conditions worldwide [1] and mutual aspects including oxidative stress, neurodegeneration, and neuroinflammation may drive the onset and progression of these morbidities. In fact, substantial research has supported the paramount involvement of the neuroimmune processes in neurodegenerative conditions [1,2]. In this scenario, microglial cells, the macrophage-like resident immune cells of the central nervous system (CNS), are well-known as core players in the neuroinflammatory events during injury or infection, thus largely assisting in brain homeostasis [3–5]. However, overactivated microglia can release several proinflammatory mediators, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β), potentially leading to neuronal demise and neurodegeneration [6,7].

Microglial cells fundamentally express all components of the purinergic system, a pivotal signaling pathway in immune responses in the brain and thus suggested to have a role during neuroinflammatory-related brain disorders [8,9]. This checkpoint immune cellular pathway mediates physiological processes in the brain through the action of a sophisticated set of receptors, enzymes, and signaling molecules [10]. In the extracellular milieu, nucleotides such as adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP), and the nucleoside adenosine (ADO) bind to specific receptors, including the P1 and P2 family of receptors, expressed on the surface of cells [11,12]. P2 receptors are further divided into P2X ionotropic and P2Y metabotropic receptors, sensitive to ATP and ADP molecules, depending on the class of receptor [13]. On the other hand, P1 type of receptors have ADO as a ligand, and can be further divided into A1, A2A, A2B, and A3 metabotropic receptors [14,15]. Generally, the P2X7 and A2A receptors are associated with the modulation of inflammation in the CNS, whereas the A1 receptor has been implicated in neuroprotection. Furthermore, enzymes such as the nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase, 5'-nucleotidase (5'-NT), and adenosine deaminase (ADA) assist in controlling the levels of extracellular nucleotides and nucleoside, thus balancing the grades of inflammatory processes within the CNS [16–18].

Natural product-derivatives and bioactive molecules are gaining considerable attention as adjuvants to prevent and/or alleviate the harmful facets of neurological conditions [19]. In this context, the phenolic compound chlorogenic acid (CGA) could be a potential candidate due to the broad spectrum of pharmacological activities, such as antioxidant [20,21], neuroprotective [22], cardioprotective [23] and anti-inflammatory [21,24] reported by the literature. CGA is found in many foods and dietary sources, by way of illustration, coffee (*Coffea arabica*) [23], vegetables like eggplant (*Solanum melongena*) [25], green tea (*Camellia sinensis*) [26], and yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a plant used in an infusion hot beverage traditionally consumed in the southern regions of South America [27], present substantial quantities of the compound.

Given the immunomodulatory properties of the purinergic signaling pathway and the potential beneficial effect of CGA, we aimed at investigating whether this compound could exert anti-inflammatory effects in a model of neuroinflammation triggered by lipopolysaccharide (LPS) and whether the purinergic pathway could be implicated in this process by using an *in vitro* model of mouse brain microglial cells.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Equipments

Chlorogenic Acid (>95%, CAS 327-97-9) and Lipopolysaccharide (from *Escherichia coli*, O111:B4) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Other reagents used in this study were obtained from Sigma-Aldrich and Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Cell culture materials were purchased from Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brazil), Corning Inc. (Corning, NY, USA), and Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brazil). Western Blot reagents and materials were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Merck KGaA, and Sigma-Aldrich. The measurement analyses were carried out using a SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The cell images were captured using a Zeiss Axiovert 40CFL inverted microscope with an Axiocam model Mrm (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

2.2. Microglial Cell Line and Culture Conditions

The mouse brain microglial cell line (BV-2, immortalized) was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, RJ, Brazil). BV-2 cells were grown and maintained following standard conditions using *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (streptomycin and penicillin, 1%) at 37°C under 5% CO₂.

2.2.1. Experimental design and exposure protocols

In this *in vitro* study, BV-2 cells were exposed to lipopolysaccharide (LPS) at the final concentration of 1 µg/mL for 6 h [28]. This molecule has been proposed to cause neuroinflammatory states and microglial activation [28–30]. LPS is known to bind to Toll-like receptors (TLRs) such as TLR4, expressed on the surface of microglial cells, leading to the activation of downstream signaling pathways including the NF-κB transcription factor, culminating in the release of proinflammatory molecules [31].

After LPS exposure, cell supernatant was removed and cells were then treated with an increasing concentration effect curve of chlorogenic acid (CGA), consisting of 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, and 300 µM of CGA [31].

Cells of the control group (C) only received the culture medium whereas cells in the LPS group received LPS (1 µg/mL) treatment for 6 h, which was then discarded and fresh culture medium was added to the cells.

For exposure protocols, cells were grown in 6-well or 12-well plates at the concentration of 1×10^5 cells/mL for 24 h and 5×10^4 cells/mL for 96 h, to evaluate acute and subchronic effects of LPS and CGA exposure.

2.2.2. Cell morphology

BV-2 cells were cultured in 6-well plates and the cell morphology was observed by optical microscopy during the period of exposure and treatments.

2.2.3. Cell proliferation assay

Cellular proliferation was measured by MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay [32]. Shortly, after the incubation with treatments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4) to remove the treatments and avoid interference. Cells were then exposed to MTT reagent for 1 h at 37°C. The formazan crystals were solubilized with DMSO and the absorbance was measured at 570 nm wavelength.

2.2.4. Cell migration protocol

The analysis on the effect of the CGA and LPS exposure on cell migration was performed following the wound healing assay. In brief, cells were grown in 12-well plates until semi-confluence (80-90%). Subsequently, a small scratch in the cell monolayer was induced using a pipette tip to create a wound. After scratch, images were captured (time 0 h). Then, cells were treated with LPS and CGA concentration curve, monitored, and photographed under inverted microscope at the beginning of the experiment (time 0 h) as well as after 24 h and 96 h to measure the size of the wound gap [33].

2.3. Oxidative metabolism indicators

2.3.1. Reactive nitrogen species (RNS) production

The levels of nitric oxide (NO) were measured indirectly by the nitrite levels, using the Griess reagent [34]. Briefly, for this protocol, cell supernatant was collected and incubated with the Griess reagent for 10 min and the absorbance was measured at 540 nm.

2.3.2. Lipid peroxidation

For this protocol, the levels of lipid peroxidation were evaluated by the reaction of malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA) and expressed as percentage of the control group [35].

2.3.3. Superoxide anion production

The production of superoxide anion was evaluated by the reaction of the Nitrotetrazolium Blue Chloride (NBT) reagent and the superoxide anion (O_2^-) [36]. Shortly, cells were incubated for 3 h at 37°C with the reagent. At last, the formazan crystals formed were solubilized with DMSO and the absorbance was measured at 550 nm wavelength.

2.4. Purinergic System Enzyme Activities

2.4.1. NTPDase [37] and 5'-NT [38] activities were determined by the release of inorganic phosphate, similarly to published guidelines. Cells were suspended in saline (NaCl, 0.9%), and 20 μ L of samples was added to the reaction system of each enzyme and preincubated at 37°C for 10 min. The initiation of the enzymatic reaction was given by adding the specific substrates for each enzyme: ATP and ADP for NTPDase and AMP for 5'-NT. The reactions were stopped by the addition of trichloro-acetic acid (TCA, 10%), and the released inorganic phosphate due to ATP, ADP, and AMP hydrolysis was determined by using malachite green as the colorimetric reagent. Absorbance was read at 630 nm. Controls were performed to correct for nonenzymatic hydrolysis. KH_2PO_4 was used as a standard curve and enzyme-specific activities were reported as nmol of Pi released per min per mg of protein.

2.4.2. ADA Activity was measured indirectly by the amount of ammonia produced by the enzyme when it acts in excess of adenosine, according to Giusti and Galanti method [39]. Cells were suspended in a solution of 21 mmol/L of adenosine (pH 6.5) at 37°C and reacted for 60 min. After the incubation period, the reaction was stopped by the addition of 167.8 mM sodium nitroprusside, 106.2 mM phenol, and a sodium hypochlorite solution. The amount of ammonia produced was quantified at 620 nm. Controls were performed for each sample to correct for any ammonia present in the sample, results were expressed as U Ado (adenosine) per mg of protein.

2.5. Protein Density

Protein density of P2X7R, A1R, A2AR, NF- κ B, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were performed based on a prior work [40]. In brief, cells were homogenized in RIPA buffer and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. Samples were separated using SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, EUA). After, membranes were blocked using 5% BSA in 0,1% TBS-T and incubated overnight at 4°C with primary antibodies P2X7R (1:500), A1R (1:500), A2AR (1:500), NF- κ B (1:1000), IL-1 β (1:500), IL-6 (1:500), and TNF- α (1:500). Then, membranes were washed, incubated with secondary antibodies (dilution 1:10,000) during 90 min at room temperature, and washed again. Finally, membranes were incubated with a quimiofluorescent substrate (Merck, Germany) and an Amersham Imager 600 equipment (GE Healthcare Life Sciences) was used to acquire images. Membranes were also reprobred for actin reactivity.

2.6. Protein Determination. The protein in samples was determined using the Coomassie Blue reagent following the method previously described and using serum albumin as standard [41]. The protein of samples (mg/mL) was adjusted according to each assay.

2.7. Statistical Analysis. Results were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post-hoc* test and presented as the mean \pm SD. GraphPad Prism software version 8.0 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analysis. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All experiments were carried out in triplicate.

3. Results

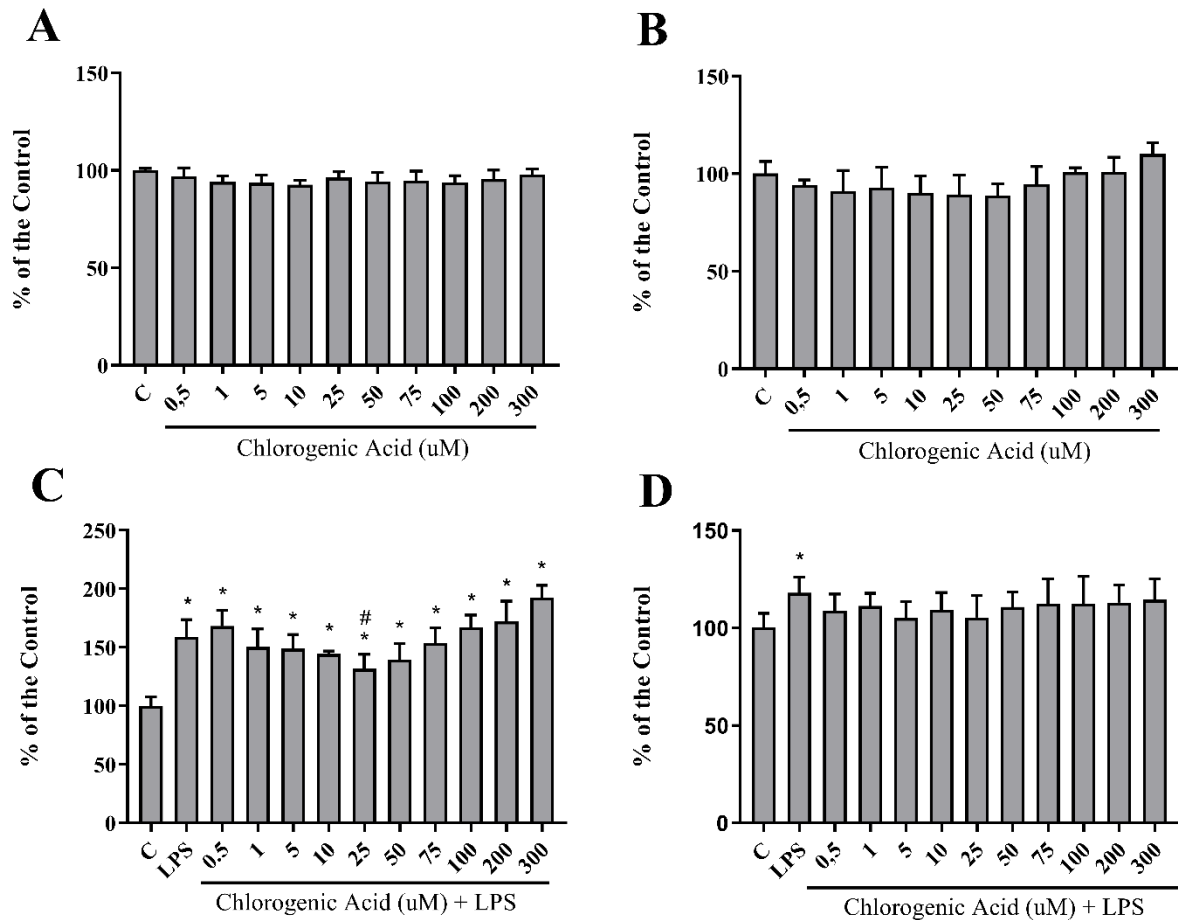


Figure 1. *In vitro* effects of increasing concentrations of Chlorogenic Acid (0.5 to 300 uM) in the cell proliferation of BV-2 cells. Cell proliferation levels evaluated by the MTT assay. After 24 hours of treatment (A). After 96 hours of treatment (B). After exposure to LPS (1µg/mL) for 6 hours and 24 hours of treatment (C). After exposure to LPS (1µg/mL) for 6 hours and 96 hours of treatment (D). C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n=8). * Represents statistical significance in comparison to negative control ($p < 0.05$). # Represents statistical significance in comparison to LPS group ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

Initially, we evaluated the effects of CGA *per se* on the proliferation of BV-2 cells. Microglia were exposed to a concentration-effect curve ranging from 0.5-300 uM during 24 h and 96 h. As shown

in **Fig. 1 A** and **1B**, no significant differences were observed in the proliferation of BV-2 cells. Next, we challenged microglial cells to a transient exposure to LPS during 6 h. Medium was then removed and fresh medium was added to cells, control and LPS groups received only culture medium whereas CGA groups received the treatment curve. As shown in **Fig. 1C** and **1D**, LPS-treated cells significantly augmented cell proliferation in comparison with control cells in both protocols, 24 h and 96 h. Cells treated with CGA concentrations in the 24 h protocol presented similar proliferation levels when compared to LPS, except for CGA 25 μM , which reduced this parameter. After 96 h, however, all CGA concentrations presented similar proliferation in relation to control cells.

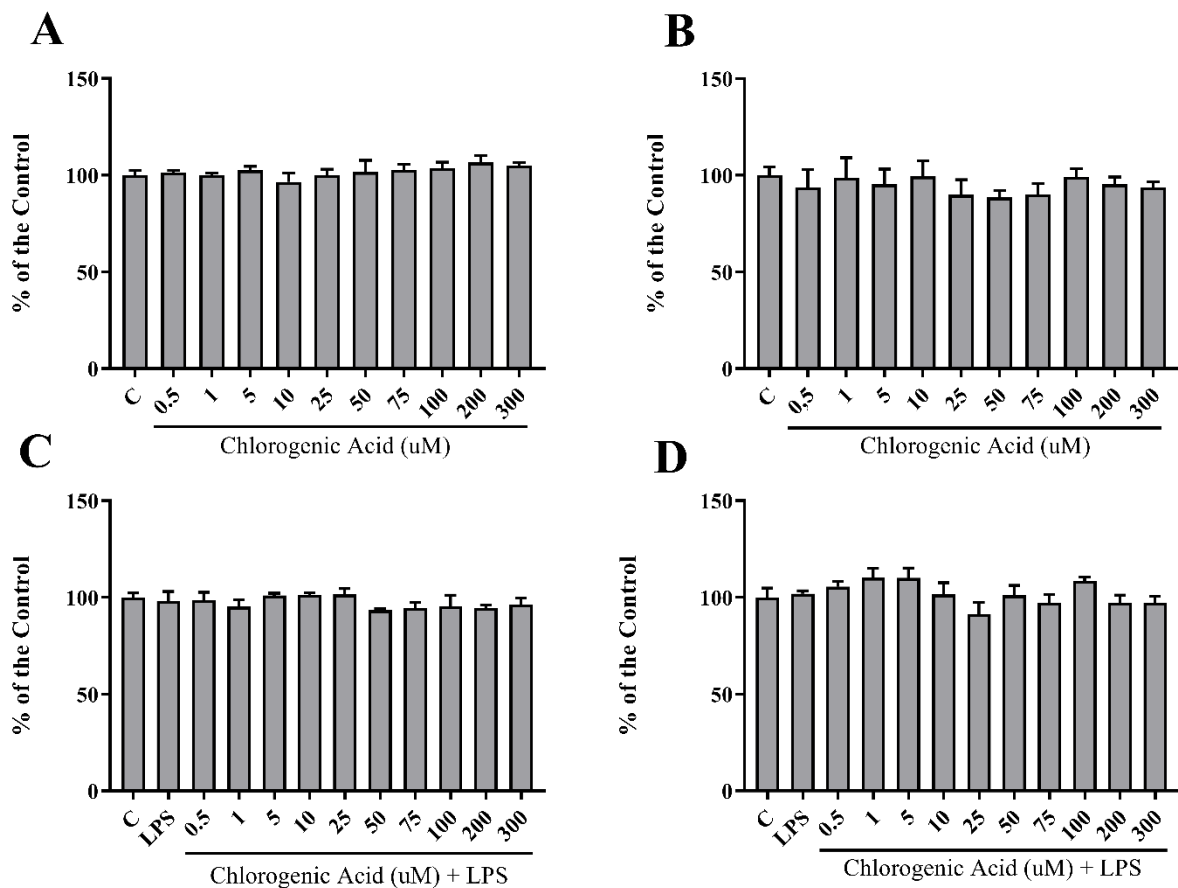


Figure 2. *In vitro* effects of increasing concentrations of Chlorogenic Acid (0.5 to 300 μM) in the lipid peroxidation levels of BV-2 cells. Lipid peroxidation levels evaluated by the MDA assay. After 24 hours of treatment (**A**). After 96 hours of treatment (**B**). After exposure to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours and 24 hours of treatment (**C**). After exposure to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours and 96

hours of treatment (**D**). C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n=8). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

Next, we assessed whether CGA could be regulating oxidative metabolism parameters. Lipid peroxidation was investigated by TBARS levels in BV-2 cells as shown in **Fig. 2**. CGA *per se* did not affect this parameter after 24 h and 96 h exposure, **Fig. 2A and 2B**, respectively. In relation to LPS-challenged cells, no significant differences were observed between groups.

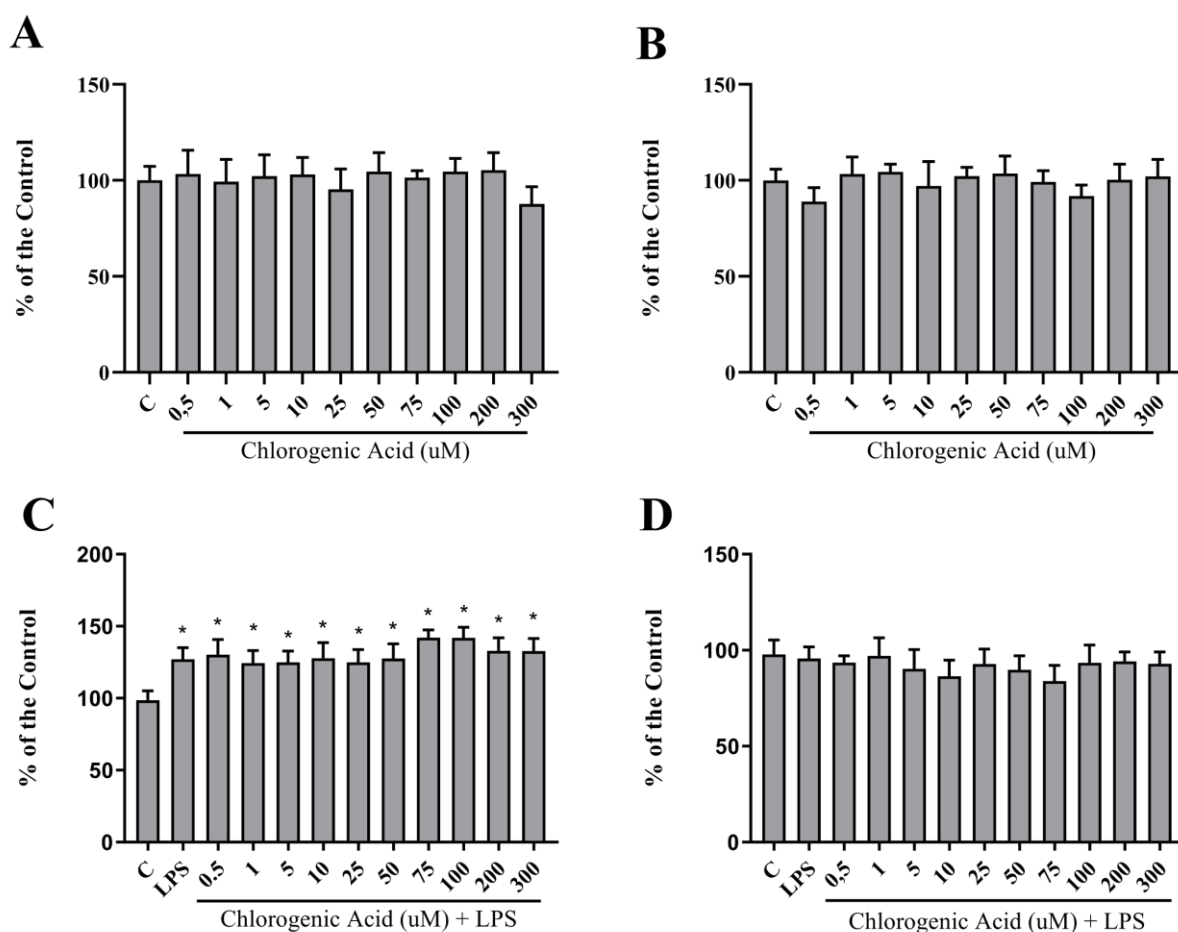


Figure 3. *In vitro* effects of increasing concentrations of Chlorogenic Acid (0.5 to 300 uM) in the superoxide levels of BV-2 cells. Superoxide levels evaluated by the Nitrotetrazolium Blue exclusion assay. After 24 hours of treatment (**A**). After 96 hours of treatment (**B**). After exposure

to LPS (1 μ g/mL) for 6 hours and 24 hours of treatment (**C**). After exposure to LPS (1 μ g/mL) for 6 hours and 96 hours of treatment (**D**). C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n=8). * Represents statistical significance in comparison to negative control ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

In relation to superoxide anion levels, results presented in **Fig. 3A** and **3B** display that none of CGA concentrations presented an effect on this parameter *per se*. In the 24 h protocol (**Fig 3C**), when cells were exposed to LPS, however, and treated with CGA, this compound was not able to diminish LPS-evoked increase in superoxide levels. In addition, in the 96 h protocol (**Fig. 3D**), no significant differences were observed regarding this parameter.

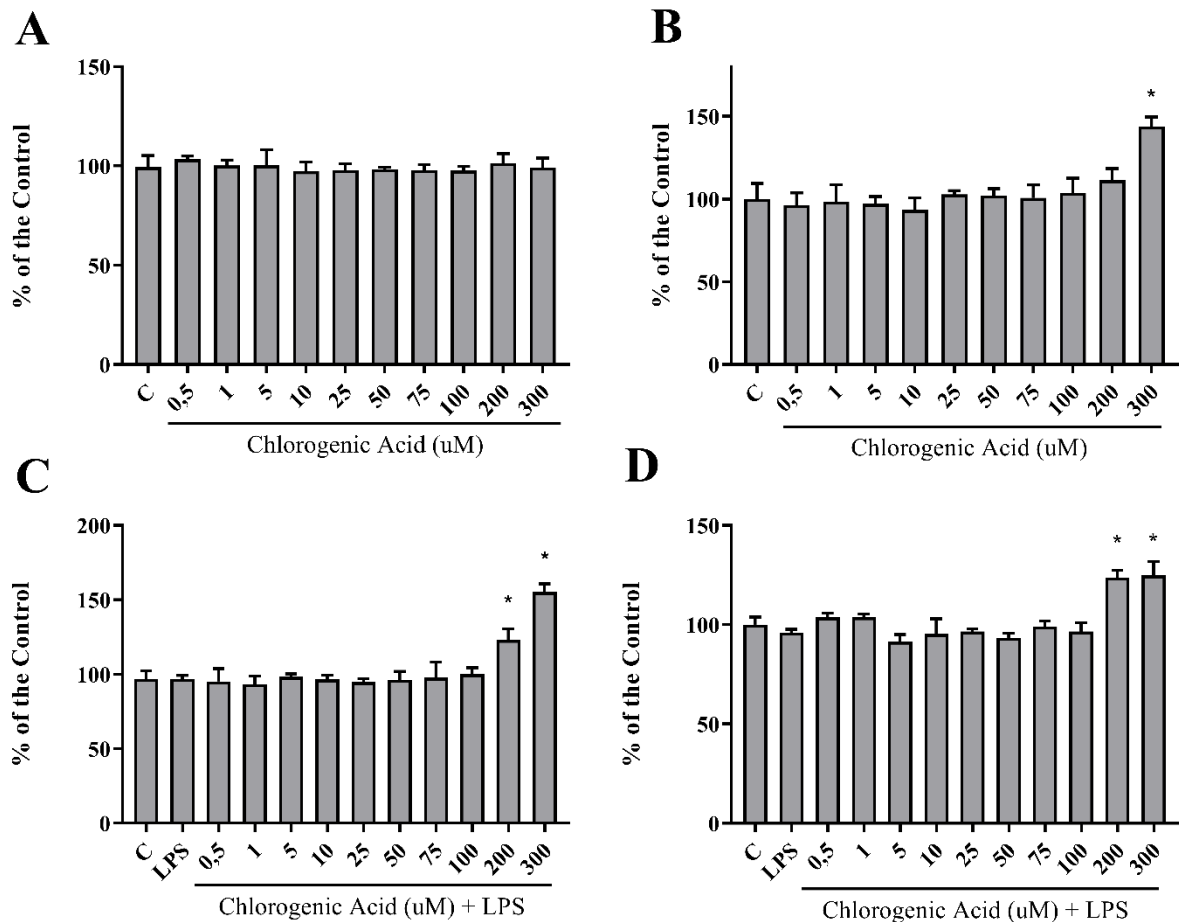


Figure 4. *In vitro* effects of increasing concentrations of Chlorogenic Acid (0.5 to 300 uM) in the nitric oxide levels of BV-2 cells. Nitric oxide levels evaluated using the Griess Reagent. After 24 hours of treatment (A). After 96 hours of treatment (B). After exposure to LPS (1 µg/mL) for 6 hours and 24 hours of treatment (C). After exposure to LPS (1 µg/mL) for 6 hours and 96 hours of treatment (D). C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n=8). * Represents statistical significance in comparison to negative control (p < 0.05). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

We further analyzed the influence of CGA on nitric oxide levels, indirectly measured by the nitrite content in samples. In cells exposed to isolated CGA, only the concentration of 300 uM increased nitrite levels in comparison to control cells after 96 h (Fig. 4B). However, after 24 h and 96 h, Fig. 4C and 4D, CGA at 200 and 300 uM increased nitric oxide levels compared to the control group.

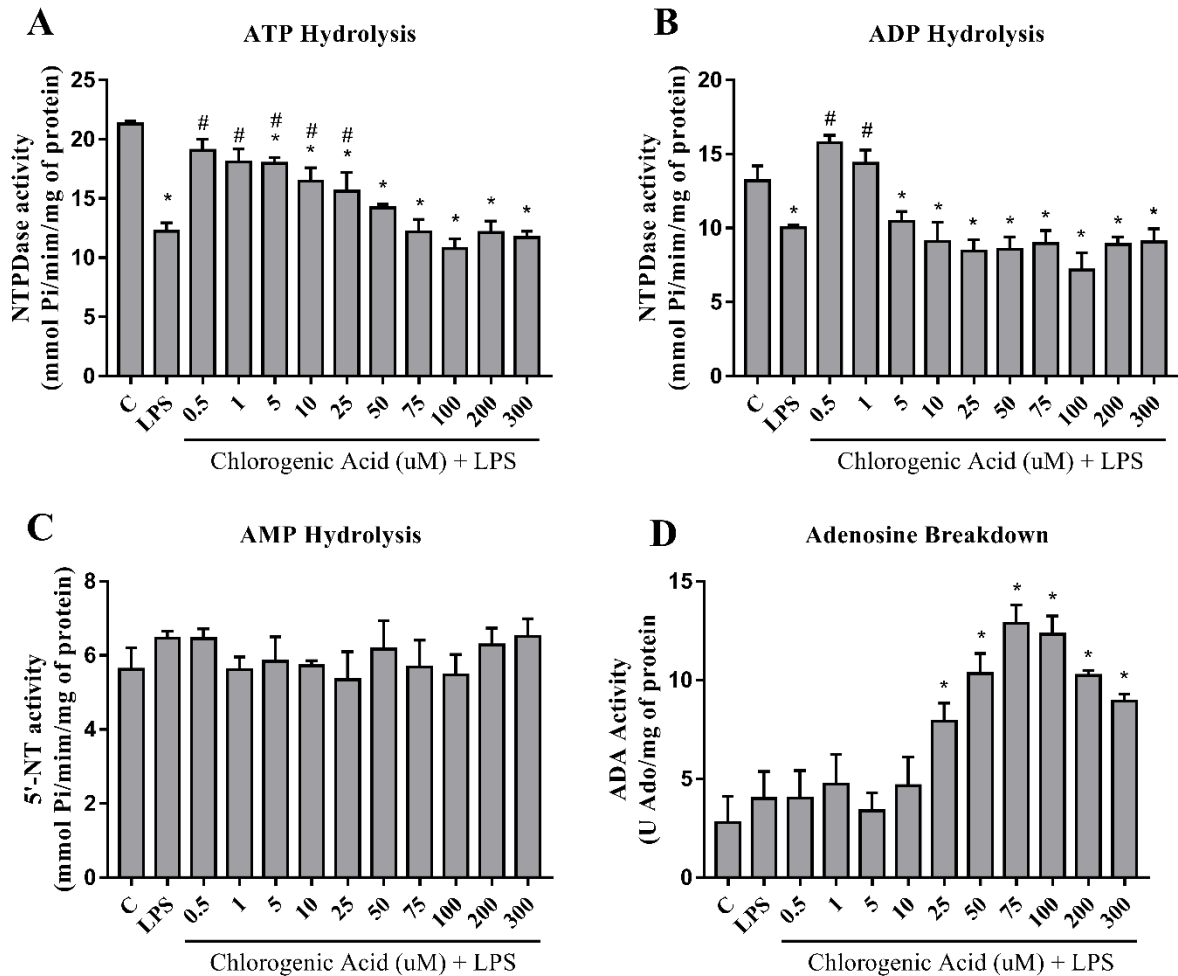


Figure 5. In vitro effects of increasing concentrations of Chlorogenic Acid (0.5 to 300 uM) in the purinergic enzyme activities of microglial BV-2 cells after 6 hours of exposure to LPS (1µg/mL) and 24 hours of treatment. NTPDase activity using (A) ATP and (B) ADP as substrates. (C) 5'-NT activity using AMP as substrate. (D) ADA activity using adenosine as substrate. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as mean ±SD (n=4). * Represents statistical significance in comparison to negative control (p < 0.05). # Represents statistical significance in comparison to LPS group (p < 0.05). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

Based on this initial screening, we selected the 24 h protocol to evaluate the modulation capability of CGA on purinergic enzyme activities. NTPDase activity was assessed by the addition of ATP and ADP nucleotides to the reaction, 5'-NT by the hydrolysis of its substrate AMP, whereas ADA was measured by the breakdown of adenosine. As displayed in **Fig. 5A**, LPS exposure reduced ATP hydrolysis compared to control cells in our model. CGA concentrations up to 25 uM reversed this effect when compared to LPS-challenged cells. However, CGA concentrations ranging from 50 to 300 uM did not reverse LPS-induced decrease in ATP hydrolysis.

Regarding ADP hydrolysis (**Fig. 5B**), treatment with LPS also decreased this parameter when compared to control cells. CGA at 0.5 and 1 uM reversed LPS-induced decrease in ADP hydrolysis, whereas higher concentrations (5-300 uM), presented similar effects when compared to LPS treatment. In relation to 5'-NT activity, no significant changes were observed in AMP hydrolysis between treatments (**Fig. 5C**). When evaluating adenosine breakdown as an indicator of ADA activity, although no significant alterations were found in LPS-exposed cells, CGA concentrations of 25 to 300 uM augmented this parameter in relation to the control group.

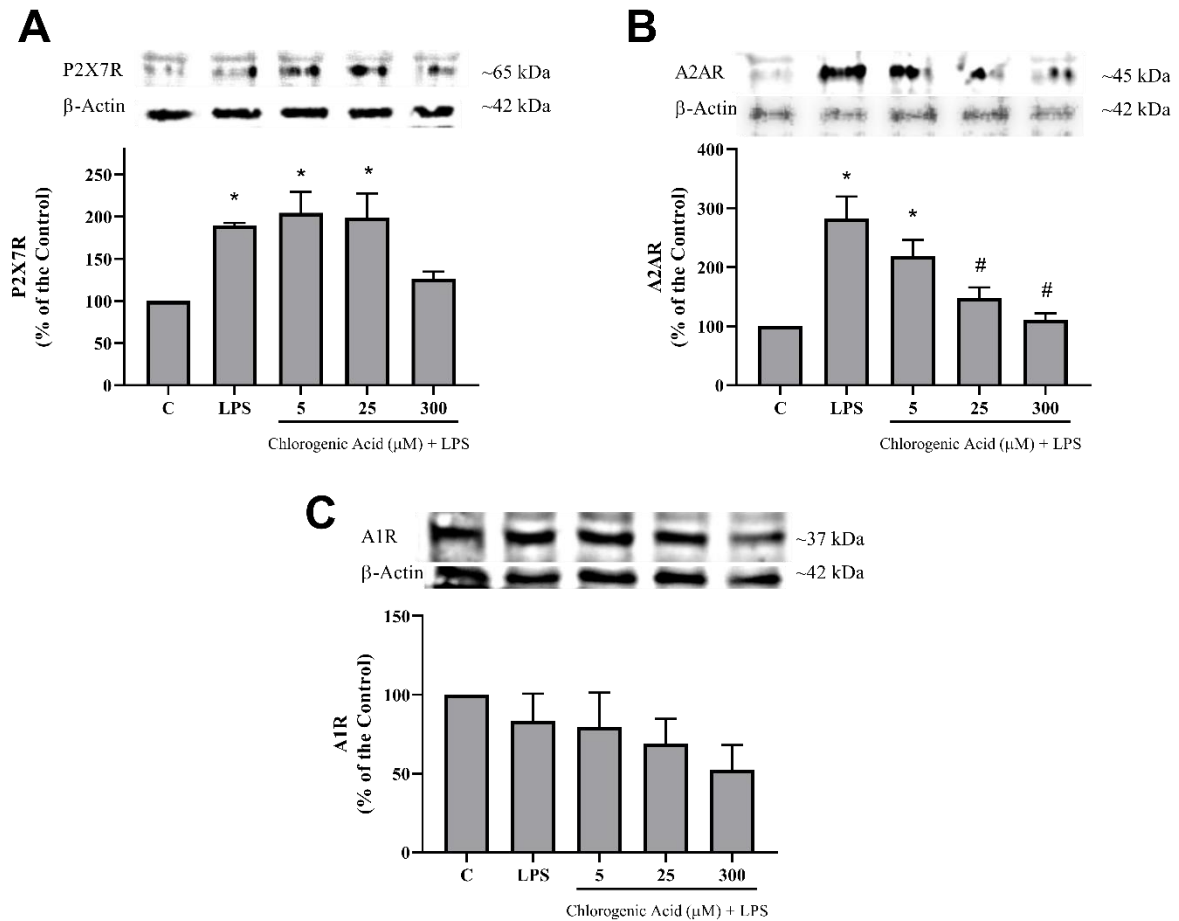


Figure 6. Protein density of purinoceptors by Western blot analysis of microglial cells treated with LPS (1µg/mL) and 24 hours of treatment. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n = 3). * Represents statistical significance in comparison to negative control ($p < 0.05$). # Represents statistical significance in comparison to LPS group ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

We then selected some CGA concentrations to further verify the effect on the modulation of P2X7, A1 and A2A purinoceptors levels by Western blot analysis. Regarding P2X7 density (**Fig. 6A**), LPS significantly increased this parameter compared to control cells and CGA 5 and 25 uM did not revert P2X7 density to control levels. In relation to A2A levels (**Fig. 6B**), LPS also significantly augmented this parameter, however, CGA at 25 and 300 uM did revert A2A levels to control

values. Moreover, A1 receptor levels were also assessed but no differences were observed between groups.

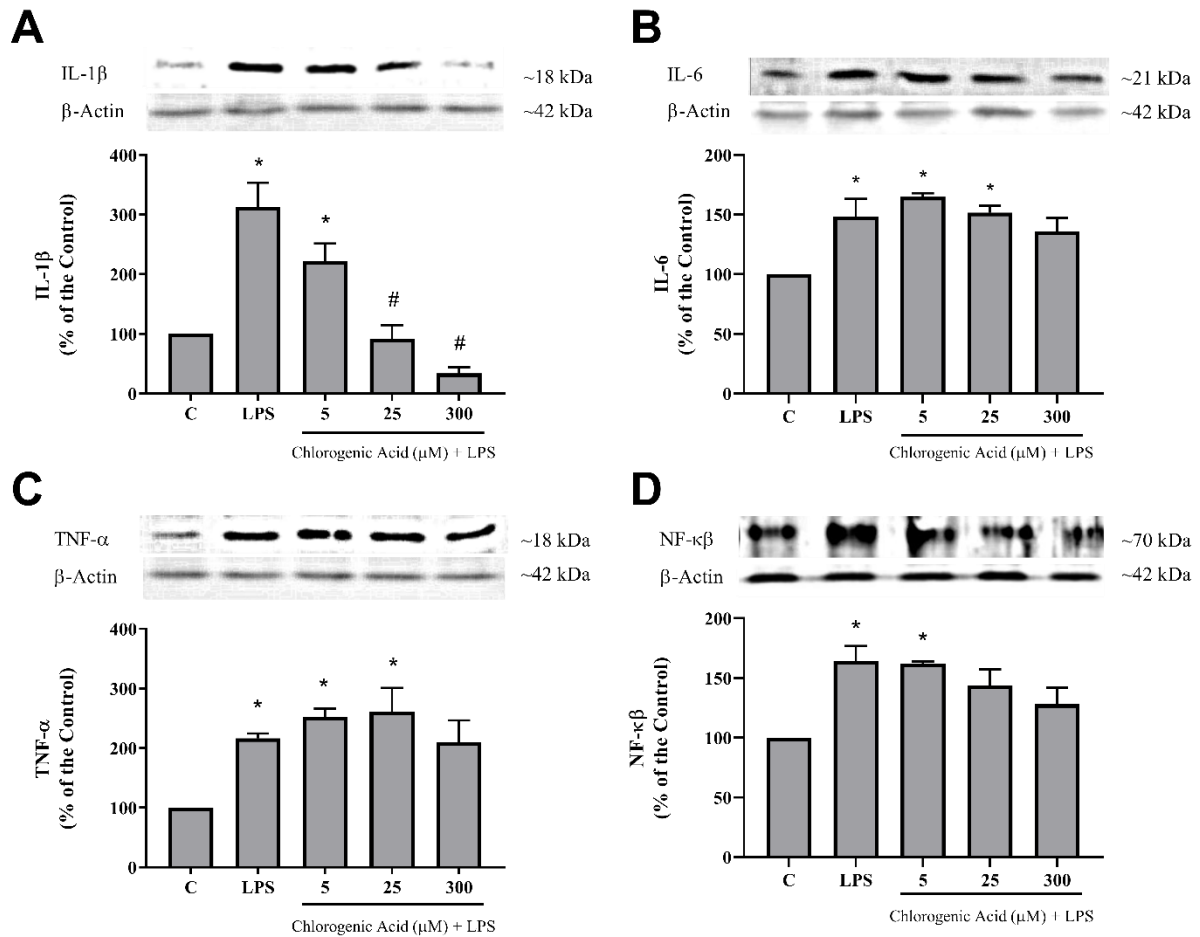


Figure 7. Protein density of inflammatory markers by Western blot analysis of microglial cells treated with LPS (1 μ g/mL) and 24 hours of treatment. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Values are expressed as a percentage of the negative control \pm SD (n = 3). * Represents statistical significance in comparison to negative control (p < 0.05). # Represents statistical significance in comparison to LPS group (p < 0.05). One-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

As CGA presented some effects regulating the levels of purinergic receptors involved with inflammatory responses, we further investigated the effect on the density of inflammatory mediators (**Fig. 7A-7D**). LPS significantly upregulated the levels of all inflammatory mediators investigated here. CGA at 5 μ M did not reverse LPS-increase in NF- κ B when compared to control cells (**Fig. 7D**), and CGA at 5 and 25 μ M presented similar increased levels compared to the control group as observed for TNF-alpha (**Fig. 7C**) and IL-6 (**Fig. 7B**) levels. However, when analyzing IL-1 beta density (**Fig. 7A**), although LPS increased this pro-inflammatory cytokine levels, CGA at 25 and 300 μ M significantly reversed this effect when compared to LPS-challenged microglia.

Furthermore, the wound healing assay was used as a feature to assess migration of BV-2 cells as displayed in **Fig. 8**. In both protocols, 24 h and 96 h, LPS significantly increased cell migration when compared to control cells. Selected CGA concentrations, however, reduced the ratio of migrated cells after LPS challenge as shown after 24 h (**Fig. 8A** and **8B**) and 96 h (**Fig. 8A** and **8C**). Additionally, we investigated the morphology of BV-2 cells after exposure to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 h and later exposure to CGA concentration-effect curve (0.5-300 μM) for 24 h and 96 h (**Supplementary Material S1-S3**).

4. Discussion

Neuroinflammation is associated with the progression of neurodegenerative disorders [5]. Despite this fact, natural compounds such as CGA, habitually consumed in beverages and food sources and presenting a wide range of biological effects, could be adjuvants mitigating the burden of brain diseases. However, research has not comprehensively investigated the routes that participate in the neuroinflammatory responses modulated by CGA and the role of the purinergic system in this scenario. From this perspective, this study aimed at determining the neuromodulatory capability of CGA and the extent of involvement of purinergic system components in an *in vitro* protocol of neuroinflammation induced by LPS.

Stimulated microglial cells may increase proliferation and migration, leading to neuronal demise and chronic inflammatory states [42]. As observed in this study, BV-2 cells treated with CGA concentration-effect curve did not alter cell proliferation and proliferation after 24 h and 96 h, showing that this compound *per se* does not present cytotoxic effects. Additionally, no significant differences were observed between CGA treatments and LPS exposure in relation to control regarding cell morphology (**Supplementary Material S1-S3**). However, microglia exposed to LPS increased parameters of cell proliferation and migration, which were overall reversed by CGA treatment. LPS can bind to TLR4 type of receptors expressed on immune cells activating downstream transcription factors, such as the NF- κB , in the nucleus [43]. This process also releases inflammatory mediators, including IL-1 β and IL-6, among others, contributing to exacerbate

neuroinflammatory responses in the brain [16,44]. However, natural compounds such as CGA could present anti-neuroinflammatory potential attenuating LPS-triggered cell migration and inflammation.

As expected, LPS triggered the activation of NF- κ B and the release of pro-inflammatory mediators (IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha). These events were partially attenuated when microglial cells were treated with CGA selected concentrations (5, 25, 300 μ M). Although CGA did not significantly decrease all pro-inflammatory cytokines, a pronounced effect was observed for IL-1beta. Based on these findings, we speculate that CGA positively regulates the levels of pro-inflammatory mediators levels and cell migration in BV-2 cells by a mechanism possibly involving the NF- κ B pathway, thus decreasing neuroinflammation. This assumption is supported by previous studies using models of LPS-stimulated primary microglia cultures [45] and RAW 264.7 cells [46]. Additionally, recent models of inflammatory-related conditions evidenced the participation of the NF- κ B pathway in the anti-inflammatory properties of CGA [47,48]. Moreover, the isomeric form of CGA, neochlorogenic acid (NCA), has also been shown to suppress LPS-elicited inflammation in BV-2 cells by inhibiting NF- κ B and pro-inflammatory cytokines [49].

It has gained momentum that purinergic signaling may be a feasible candidate pathway participating in the neuroinflammatory events in the brain [8], as microglial cells largely express components of the purinergic system [16,50]. In this sense, we investigated here the extent of participation of purinergic components in the neuroinflammation protocol triggered by LPS. The activity of purinergic enzymes including NTPDase, 5'-NT, and ADA was investigated by the metabolism of ATP and ADP, AMP, and adenosine, respectively. ATP hydrolysis was significantly decreased in LPS-exposed cells, and this effect was reversed by CGA concentrations (≥ 25 μ M), however, higher CGA concentrations presented similar effects compared to LPS. In addition, regarding ADP hydrolysis, only 0.5 and 1 μ M of CGA were able to revert LPS effects evaluating NTPDase activity. ATP is a core molecule in the inflammatory events in the brain being released by injured cells, including microglial cells [51], generally eliciting pro-inflammatory events^{9,11}. LPS has also previously been shown to decrease the activity of NTPDase [40,52,53], leading to the speculation that ATP levels may be increased in the extracellular environment of our model. Despite this fact, lower CGA concentrations, as mentioned above, were able to revert these changes, possibly by the anti-inflammatory effects of this phenolic compound.

Prior research has suggested that an extract containing various molecules, including CGA [54], and isolated ferulic acid, which has a similar chemical structure to CGA [55], modulate purinergic enzyme activities. Furthermore, our research group provided evidence that CGA may regulate purinergic system components [56], in models of diabetes [57] and demyelination [58]. In fact, substantial attention has been devoted to understanding the role of purinergic signaling and natural compounds in pathologies such as diabetes [59]. Interestingly, when investigating purinergic enzymes activities in a model of diabetes, ADP hydrolysis was decreased in CGA concentrations $\geq 5 \mu\text{M}$ and this could be further explored in the future as the ADP molecule has significant impact in platelet aggregation and CGA appears to hinder platelet aggregation in the presence of ADP [57]. Moreover, in a recent study using a diabetes model, the compound caffeic acid, which is chemically related to CGA, decreased ATP and ADP, whereas ADO breakdown was increased in lymphocytes [60]. These results indicate the impact of CGA and similar compounds on purinergic signaling and potentially on the regulation of immune functions since caffeic acid also modulated the production of inflammatory mediators [60]. In addition, from these outcomes, it is noteworthy to mention that ADP signaling may exert a relevant contribution in CGA effects in the brain. However, the role of ADP and CGA in this tissue is still less comprehended as other receptors, such as metabotropic P2Y receptors, may be involved in CGA effects in microglial cells.

Furthermore, the outcomes of our study also indicated that higher CGA concentrations increased adenosine breakdown in LPS-challenged cells, a nucleoside recognized to possess majoritarily anti-inflammatory functions [15,61]. Thus, to refine our interpretation on the involvement of purinergic components in the immunomodulatory effects of CGA, we analyzed the protein levels of purinoceptors P2X7, sensitive to nucleotides such as ATP, and A1 and A2A receptors, that present affinity to adenosine. In fact, adenosine signaling is a major route involved in the inflammatory responses in the brain [62]. Whereas A1 receptors are overall related with neuroprotection, A2A in addition to P2X7 receptors are commonly associated with neuroinflammation and neurodegeneration [63].

In our study, LPS significantly increased A2A receptor density and CGA (25 and 300 μM) was able to abolish this event. Besides their role in inflammation since the blockade of A2A receptors may afford neuroprotection by alleviating inflammatory responses [64], these receptors have also been implicated in the microglial switch to an amoeboid phenotype [65]. Although CGA chemical

structure has been suggested to have the capacity to bind to A2A receptors, potentially acting as an agonist [66], the downregulation of A2A expression levels seemed to contribute to minimizing LPS-triggered activation profile, also observed in the cell migration protocol (**Fig. 8**). Nevertheless, CGA effects on adenosine signaling in the brain are still largely unknown and need to be further clarified in order to draw better conclusions.

Furthermore, we also hypothesized that P2X7-mediated signaling could participate in CGA immunomodulatory action. P2X7 receptors are ion-gated channels responsive to ATP leading to the influx of Na and Ca and to the efflux of K [67]. In activated microglia, the upregulation of this class of purinoceptors is involved with a secretory phase by triggering the assembly of the NLRP3 inflammasome and release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1beta, culminating in the increase of neuroinflammation [16]. As observed in our study, LPS-elicited increase in IL-beta was accompanied by the increase in the P2X7 protein levels. Although CGA did not significantly alter P2X7 receptor density, this phenolic compound (25 and 300 uM) significantly abrogated LPS-induced IL-beta increase, a main driver of inflammatory reactions.

CGA may also be a promising compound to mitigate oxidative stress conditions related to neurological morbidities [21,68]. In our study, CGA *per se* did not significantly alter oxidative status of BV-2 cells, except for higher concentrations (≥ 200 uM) that increased nitrite levels, indicating that CGA in general does not increase oxidative stress in microglial cells. Surprisingly, although LPS significantly induced inflammatory reactions in BV-2-challenged cells, this molecule did not significantly increase oxidative stress, except for superoxide levels, probably due to the exposure time. Additionally, CGA after 24 h was not able to revert this parameter. Intriguingly, it seems that CGA may not greatly interfere with oxidative stress in the model proposed here. Still, our results do not invalidate the potential of this compound in management of oxidative stress-related conditions [69], but further studies are necessary to clarify this issue as other pathways may be involved in CGA antioxidant activity.

5. Conclusion

This study outlined the possible involvement of purinergic system components in the anti-neuroinflammatory activity of CGA in LPS-challenged BV-2 microglial cells. CGA significantly attenuated the production of pro-inflammatory cytokines, mainly IL-1beta, and cell migration. Despite the constraints of *in vitro* protocols, we highlight that CGA may be a phenolic acid to be further investigated as a promising therapeutic strategy for the management of neuroinflammatory responses associated with neurodegenerative conditions.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Brazilian agencies for providing funding and scholarships.

Funding statement

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES; Finance Code 001], CAPES [CAPES/PROEX fellowship grant, process number 88887.340075/2019-00, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul [FAPERGS].

CRedit authorship contribution statement

Vitor Bastianello Mostardeiro: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Charles Elias Assmann: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Grazielle Castagna Cezimbra Weis: Investigation, Methodology

Vanessa Valéria Miron: Investigation, Methodology

Milagros Fanny Vera Castro: Investigation, Methodology

Taís Vidal Palma: Investigation, Methodology

Cinthia Melazzo de Andrade: Investigation, Methodology.

Ivana Beatrice Mânica da Cruz: Investigation, Methodology.

Maria Rosa Chitolina Schetinger: Project administration, Supervision, Writing – review & editing.

Vera Maria Melchiors Morsch: Project administration, Supervision, Writing – review & editing.

References

1. Prince, M. *et al.* The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* **9**, 63-75.e2 (2013).
2. Gan, L., Cookson, M. R., Petrucelli, L. & La Spada, A. R. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nature Neuroscience* (2018) doi:10.1038/s41593-018-0237-7.
3. Domingues, C., da Cruz e Silva, O. A. B. & Henriques, A. G. Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks. *Curr. Alzheimer Res.* (2017) doi:10.2174/1567205014666170317113606.
4. Martin, E. & Delarasse, C. Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. *Biomedical Journal* (2018) doi:10.1016/j.bj.2018.01.002.
5. Kwon, H. S. & Koh, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* (2020) doi:10.1186/s40035-020-00221-2.
6. Zhu, M., Wang, X., Schultzberg, M. & Hjorth, E. Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid- β 42 and lipopolysaccharides in human microglia. *J. Alzheimer's Dis.* (2014) doi:10.3233/JAD-141233.
7. Cheng, H. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester attenuates neuropathic pain by suppressing the p38/NF- κ B signal pathway in microglia. *J. Pain Res.* (2018) doi:10.2147/JPR.S166274.
8. Beamer, E. *et al.* Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* (2016) doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.019.
9. Calovi, S., Mut-Arbona, P. & Sperlágh, B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience* (2019) doi:10.1016/j.neuroscience.2018.12.021.

10. Martin, E. *et al.* New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatry* (2019) doi:10.1038/s41380-018-0108-3.
11. Junger, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology* (2011) doi:10.1038/nri2938.
12. Sperlagh, B. & Sylvester Vizi, E. The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia: Pharmacological and Clinical Aspects. *Curr. Top. Med. Chem.* (2011) doi:10.2174/156802611795347564.
13. Burnstock, G. Purinergic signalling: Therapeutic developments. *Frontiers in Pharmacology* (2017) doi:10.3389/fphar.2017.00661.
14. Kukulski, F., Lévesque, S. A. & Sévigny, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. in *Advances in Pharmacology* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00009-6.
15. Di Virgilio, F. & Vuerich, M. Purinergic signaling in the immune system. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (2015) doi:10.1016/j.autneu.2015.04.011.
16. Illes, P., Rubini, P., Ulrich, H., Zhao, Y. & Tang, Y. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. *Cells* (2020) doi:10.3390/cells9051108.
17. Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M. & Inoue, K. *Role of Purinergic Receptors in CNS Function and Neuroprotection*. *Advances in Pharmacology* vol. 61 (Elsevier Inc., 2011).
18. Burnstock, G. Introduction to purinergic signaling. *Methods in Molecular Biology* (2020) doi:10.1007/978-1-4939-9717-6_1.
19. Heitman, E. & Ingram, D. K. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutritional Neuroscience* (2017) doi:10.1179/1476830514Y.0000000146.

20. Bonarska-Kujawa, D., Cyboran-Mikołajczyk, S. & Kleszczyńska, H. Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* (2015) doi:10.3109/09687688.2015.1031833.
21. Liang, N. & Kitts, D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients* (2015) doi:10.3390/nu8010016.
22. Kwon, S. H. *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* (2010) doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001.
23. Stefanello, N. *et al.* Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food Chem. Toxicol.* (2019) doi:10.1016/j.fct.2018.10.005.
24. Zhang, X. *et al.* Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Injury* **41**, 746–752 (2010).
25. Lu, H., Tian, Z., Cui, Y., Liu, Z. & Ma, X. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* (2020) doi:10.1111/1541-4337.12620.
26. Hayakawa, S. *et al.* Anti-cancer effects of green tea epigallocatechin-3-gallate and coffee chlorogenic acid. *Molecules* (2020) doi:10.3390/molecules25194553.
27. da Silveira, T. F. F. *et al.* Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. *Food Res. Int.* (2017) doi:10.1016/j.foodres.2017.09.098.
28. Nam, H. Y. *et al.* Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. *J. Neuroinflammation* (2018) doi:10.1186/s12974-018-1308-0.
29. Bachstetter, A. D. *et al.* Microglial p38 α MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (A β). *J. Neuroinflammation* (2011) doi:10.1186/1742-

2094-8-79.

30. Qin, L. *et al.* Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* (2007) doi:10.1002/glia.20467.
31. Bao, L. *et al.* Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* (2018) doi:10.1016/j.intimp.2017.11.021.
32. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (1983) doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
33. Bürk, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 369–372 (1973).
34. Grisham, M. B., Johnson, G. G. & Lancaster, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* (1996) doi:10.1016/s0076-6879(96)68026-4.
35. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* (1979) doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
36. Hyung, S. C., Jun, W. K., Cha, Y. N. & Kim, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunoass. Immunochem.* (2006) doi:10.1080/15321810500403722.
37. Leal, D. B. R. *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase; ecto- diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* (2005) doi:10.1016/j.bbagen.2004.09.006.
38. Heymann, D., Reddington, M. & Kreutzberg, G. W. Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain. *J. Neurochem.* (1984) doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb12832.x.

39. Giusti G & Galanti B. Adenosine deaminase: colorimetric method. in *Methods of Enzymatic Analysis* (1984).
40. Assmann, C. E. *et al.* Aluminum-Induced Alterations in Purinergic System Parameters of BV-2 Brain Microglial Cells. *J. Immunol. Res.* (2021) doi:10.1155/2021/2695490.
41. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
42. Scheiblich, H. & Bicker, G. Regulation of microglial migration, phagocytosis, and neurite outgrowth by HO-1/CO signaling. *Dev. Neurobiol.* (2015) doi:10.1002/dneu.22253.
43. Naveed, M. *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2018) doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064.
44. Hemonnot, A. L., Hua, J., Ulmann, L. & Hirbec, H. Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–20 (2019).
45. Shen, W. *et al.* Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* (2012) doi:10.1016/j.brainresbull.2012.04.010.
46. Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J. & Kim, K. W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide- stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm. Res.* (2014) doi:10.1007/s00011-013-0674-4.
47. Zeng, J. *et al.* Chlorogenic Acid Suppresses miR-155 and Ameliorates Ulcerative Colitis through the NF- κ B/NLRP3 Inflammasome Pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* (2020) doi:10.1002/mnfr.202000452.
48. Chen, Q., Lei, Y. Q., Liu, J. F., Wang, Z. C. & Cao, H. Beneficial effects of chlorogenic acid treatment on neuroinflammation after deep hypothermic

- circulatory arrest may be mediated through CYLD/NF- κ B signaling. *Brain Res.* (2021) doi:10.1016/j.brainres.2021.147572.
49. Kim, M., Choi, S. Y., Lee, P. & Hur, J. Neochlorogenic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Activation and Pro-inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells. *Neurochem. Res.* (2015) doi:10.1007/s11064-015-1659-1.
 50. Burnstock, G. Purinergic signalling: Past, present and future. in *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2009). doi:10.1590/S0100-879X2008005000037.
 51. Rodrigues, R. J., Tomé, A. R. & Cunha, R. A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Frontiers in Neuroscience* (2015) doi:10.3389/fnins.2015.00148.
 52. Zanin, R. F. *et al.* Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0031205.
 53. Miron, V. V. *et al.* Physical exercise prevents alterations in purinergic system and oxidative status in lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. *J. Cell. Biochem.* (2019) doi:10.1002/jcb.27590.
 54. Oboh, G., Adewuni, T. M., Ademiluyi, A. O., Olasehinde, T. A. & Ademosun, A. O. Phenolic Constituents and Inhibitory Effects of Hibiscus sabdariffa L. (Sorrel) Calyx on Cholinergic, Monoaminergic, and Purinergic Enzyme Activities. *J. Diet. Suppl.* (2018) doi:10.1080/19390211.2017.1406426.
 55. Salau, V. F. *et al.* Ferulic Acid Modulates Dysfunctional Metabolic Pathways and Purinergic Activities, While Stalling Redox Imbalance and Cholinergic Activities in Oxidative Brain Injury. *Neurotox. Res.* **37**, 944–955 (2020).
 56. Stefanello, N. *et al.* Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food Chem. Toxicol.* (2019) doi:10.1016/j.fct.2018.10.005.
 57. Stefanello, N. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine and coffee on

- components of the purinergic system of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* (2016) doi:10.1016/j.jnutbio.2016.08.015.
58. Leal, C. A. M. *et al.* Effects of chlorogenic acid on adenine nucleotides hydrolyzing enzyme activities and expression in platelets of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Biomed. Pharmacother.* (2016) doi:10.1016/j.biopha.2016.04.003.
59. Reichert, K. P. *et al.* Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2021) doi:10.1016/j.biopha.2021.111273.
60. Castro, M. F. V. *et al.* Modulatory effects of caffeic acid on purinergic and cholinergic systems and oxi-inflammatory parameters of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* (2021) doi:10.1016/j.lfs.2021.119421.
61. Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P. & Haskó, G. Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer* (2013) doi:10.1038/nrc3613.
62. Boison, D., Chen, J. F. & Fredholm, B. B. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death and Differentiation* (2010) doi:10.1038/cdd.2009.131.
63. Cheffer, A. *et al.* Purinergic system in psychiatric diseases. *Molecular Psychiatry* (2018) doi:10.1038/mp.2017.188.
64. Rebola, N. *et al.* Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J. Neurochem.* (2011) doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07178.x.
65. Orr, A. G., Orr, A. L., Li, X. J., Gross, R. E. & Traynelis, S. F. Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nat. Neurosci.* (2009) doi:10.1038/nn.2341.
66. Fuentes, E., Caballero, J., Alarcón, M., Rojas, A. & Palomo, I. Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. *PLoS One* (2014) doi:10.1371/journal.pone.0090699.

67. Di Virgilio, F. *et al.* Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. *Methods Enzymol.* **629**, 115–150 (2019).
68. Nabavi, S. F. *et al.* Chlorogenic Acid and Mental Diseases: From Chemistry to Medicine. *Curr. Neuropharmacol.* (2016) doi:10.2174/1570159x14666160325120625.
69. Stefanello, N. *et al.* Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* (2014) doi:10.1007/s11010-013-1919-9.

Supplementary Information:**Chlorogenic acid anti-neuroinflammatory effect modulated by purinergic signaling in LPS-challenged mouse brain microglial cells**

Authors: Vitor Bastianello Mostardeiro, Charles Elias Assmann, Grazielle Castagna Cezimbra Weis, Vanessa Valéria Miron, Milagros Fanny Vera Castro, Taís Vidal Palma, Cinthia Melazzo de Andrade, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Melchiors Morsch.

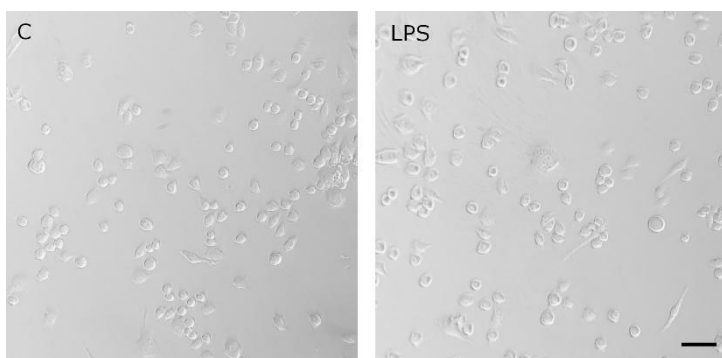


Figure S1. BV-2 cells after exposure to LPS (1 µg/mL) for 6 hours. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Magnification = 100x, Scale bar = 20 µm.

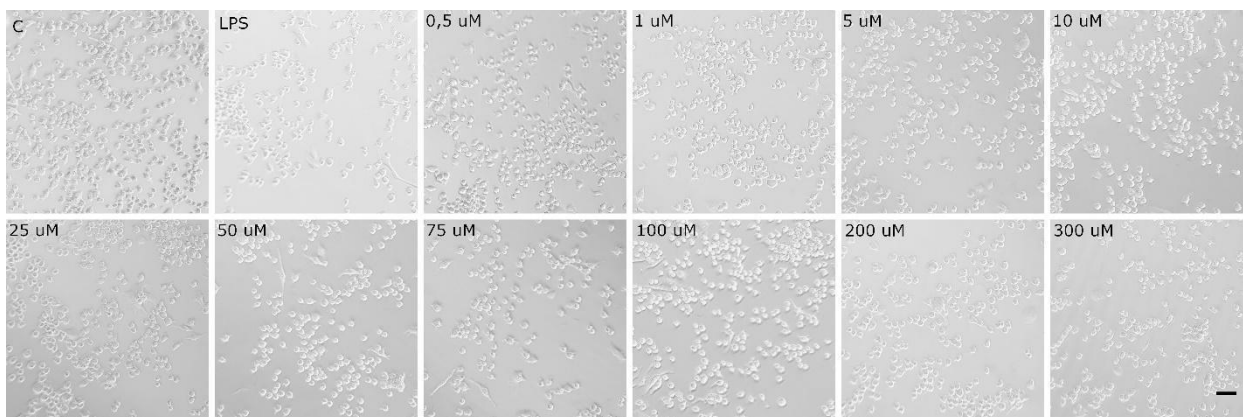


Figure S2. BV-2 cells after exposure to LPS (1 μ g/mL) for 6 hours and increasing concentrations of Chlorogenic Acid for 24 hours. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Magnification = 100x, Scale Bar = 20 μ m.

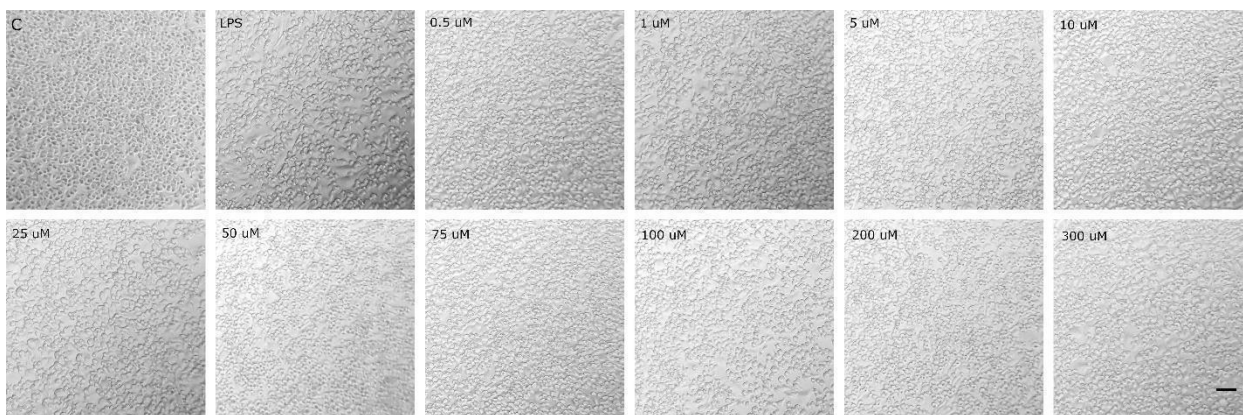


Figure S3. BV-2 cells after exposure to LPS (1 μ g/mL) for 6 hours and increasing concentrations of Chlorogenic Acid for 96 hours. C = negative control; LPS = lipopolysaccharide. Magnification = 100x, Scale bar = 20 μ m.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu o possível envolvimento de componentes do sistema purinérgico na atividade anti-inflamatória do Ácido Clorogênico em micróglia ativadas por LPS. Desta forma, conclui-se que o tratamento com CGA reduziu o processo inflamatório causado pela exposição ao LPS, tendo em vista os resultados obtidos nos níveis de hidrólise de ATP, enzima Adenosina Desaminase e nos níveis proteicos dos receptores purinérgicos P2X7 e A2A, além das citocinas inflamatórias, como a IL-1 β . Ainda, o tratamento com CGA também apresentou efeito antiproliferativo, em relação à migração microglial induzida por LPS. Também é possível concluir que o tratamento com CGA no protocolo testado não apresentou efeitos anti-oxidantes. Sendo assim, o presente estudo destaca que o Ácido Clorogênico apresenta promissora atividade anti-inflamatória em células microgliais. Apesar das restrições de protocolos *in vitro*, o trabalho realçou o CGA como um ácido fenólico a ser investigado mais a fundo, representando uma possível estratégia terapêutica para o controle de respostas neuroinflamatórias associadas com doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>;
- ANTONIOLI, L., BLANDIZZI, C., PACHER, P., & HASKÓ, G. Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. **Nature Reviews Cancer**, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>;
- BAKAR, C., KARAMAN, H. I. Ö., BABA, A., & ŞENGÜNALP, F. Effect of high aluminum concentration in water resources on human health, case study: Biga peninsula, northwest part of turkey. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9435-3>;
- BALLARD, C., GAUTHIER, S., CORBETT, A., BRAYNE, C., AARSLAND, D., & JONES, E. Alzheimer's disease. **The Lancet**, 377(9770), 1019–1031, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9);
- BAO, L., LI, J., ZHA, D., ZHANG, L., GAO, P., YAO, T., & WU, X. Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF-κB pathways. **International Immunopharmacology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.021>;
- BARNHAM, K. J., MASTERS, C. L., & BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidatives stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>;
- BARTUS, R., DEAN, R., BEER, B., & LIPPA, A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, 1982. <https://doi.org/10.1126/science.7046051>;
- BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology**, 2000. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7397>;
- BEAMER, E., GÖLÖNCSEÉR, F., HORVÁTH, G., BEKO, K., OTROKOCSI, L., KOVÁNYI, B., & SPERLÁGH, B. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. **Neuropharmacology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.09.019>;

- BONARSKA-KUJAWA, D., CYBORAN-MIKOŁAJCZYK, S., KLESZCZYŃSKA, H. Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. **Molecular Membrane Biology**, 2015. <https://doi.org/10.3109/09687688.2015.1031833>;
- BONITA, J. S., MANDARANO, M., SHUTA, D., & VINSON, J. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. In **Pharmacological Research**, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.006>;
- BREIJYEH, Z., KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules**, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>;
- BURNSTOCK, G., KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3);
- CALOVI, S., MUT-ARBONA, P., & SPERLÁGH, B. Microglia and the Purinergic Signaling System. **Neuroscience**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.021>;
- CHENG, H., ZHANG, Y., LU, W., GAO, X., XU, C., & BAO, H. Caffeic acid phenethyl ester attenuates neuropathic pain by suppressing the p38/NF-κB signal pathway in microglia. **Journal of Pain Research**, 2018. <https://doi.org/10.2147/JPR.S166274>;
- CUMMINGS, J. L., TONG, G., & BALLARD, C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. **Journal of Alzheimer's Disease**, 2019. <https://doi.org/10.3233/JAD-180766>;
- DEL CASTILLO, M. D., AMES, J. M., & GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf011702q>;
- DI VIRGILIO, F., VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>;
- DOMINGUES, C., DA CRUZ E SILVA, O. A. B., & HENRIQUES, A. G. Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks. **Current Alzheimer Research**, 2017. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170317113606>;
- EKDAHL, C. T., KOKAIA, Z., & LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis:

- The dual role of microglia. **Neuroscience**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.052>;
- GRAEBER, M. B., LI, W., & RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. **FEBS Letters**, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.033>;
- GUPTA, V. B., ANITHA, S., HEGDE, M. L., ZECCA, L., GARRUTO, R. M., RAVID, R., SHANKAR, S. K., STEIN, R., SHANMUGAVELU, P., & JAGANNATHA RAO, K. S. Aluminium in Alzheimer's disease: Are we still at a crossroad?. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4317-3>;
- HABTEMARIAM, S. (2016). Protective Effects of Caffeic Acid and the Alzheimer's Brain: An Update. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2016. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161130100947>;
- HAMLEY, I. W. The amyloid beta peptide: A chemist's perspective. role in Alzheimer's and fibrillization. **Chemical Reviews**, 112(10), 5147–5192, 2012. <https://doi.org/10.1021/cr3000994>;
- HANZEL, C. E., PICHET-BINETTE, A., PIMENTEL, L. S. B., IULITA, M. F., ALLARD, S., DUCATENZEILER, A., DO CARMO, S., & CUELLO, A. C. Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.026>;
- Heitman, E., & Ingram, D. K. (2017). Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. In *Nutritional Neuroscience*. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000146>
- HEMONNOT, A. L., HUA, J., ULMANN, L., & HIRBEC, H. Microglia in Alzheimer disease: Well-known targets and new opportunities. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9 (Jul), 1–20, 2019. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00233>;
- HENEKA, M. T., CARSON, M. J., KHOURY, J. EL, LANDRETH, G. E., BROSSERON, F., FEINSTEIN, D. L., JACOBS, A. H., WYSS-CORAY, T., VITORICA, J., RANSOHOFF, R. M., HERRUP, K., FRAUTSCHY, S. A., FINSEN, B., BROWN, G. C., VERKHRATSKY, A., YAMANAKA, K., KOISTINAHO, J., LATZ, E., HALLE, A., ... KUMMER, M. P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, 2015. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5);
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tábuas Completas de Mortalidade**, 2018. Acessado em 01 de Setembro de 2021, em:

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9126-tabuas-completas-de-mortalidade.html?=&t=downloads>;

ILLES, P., RUBINI, P., ULRICH, H., ZHAO, Y., & TANG, Y. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. **Cells**, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9051108>;

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, 2011. <https://doi.org/10.1038/nri2938>;

KIM, H. S., & SUH, Y. H. Minocycline and neurodegenerative diseases. In **Behavioural Brain Research**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.040>;

LENG, F., EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, 17(3), 157–172, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>;

LU, Y. C., YEH, W. C., & OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>;

MARTIN, E., AMAR, M., DALLE, C., YOUSSEF, I., BOUCHER, C., LE DUGOU, C., BRÜCKNER, M., PRIGENT, A., SAZDOVITCH, V., HALLE, A., KANELLOPOULOS, J. M., FONTAINE, B., DELATOUR, B., & DELARASSE, C. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. **Molecular Psychiatry**, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>;

MARTIN, E., & DELARASSE, C. Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. **Biomedical Journal**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.01.002>;

MCLACHLAN, D. R. C., BERGERON, C., ALEXANDROV, P. N., WALSH, W. J., POGUE, A. I., PERCY, M. E., KRUCK, T. P. A., FANG, Z., SHARFMAN, N. M., JABER, V., ZHAO, Y., LI, W., & LUKIW, W. J. Aluminum in Neurological and Neurodegenerative Disease. **Molecular Neurobiology**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1441-x>;

MCGIRR, S. VENEGAS, C. SWAMINATHAN, A. Alzheimers Disease: A Brief Review. **Journal of Experimental Neurology**, 2020. <https://doi.org/10.33696/neurol.1.015>;

MIKAMI, Y., & YAMAZAWA, T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. **Life Sciences**, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.08.005>;

MULLARD, A. Controversial Alzheimer's drug approval could affect other diseases. **Nature**, 595(7866), 162–163, 2021. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01763-9>;

NAM, H. Y., NAM, J. H., YOON, G., LEE, J. Y., NAM, Y., KANG, H. J., CHO, H. J., KIM, J., & HOE, H. S. Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. **Journal of Neuroinflammation**, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1308-0>;

NAVEED, M., HEJAZI, V., ABBAS, M., KAMBOH, A. A., KHAN, G. J., SHUMZAID, M., AHMAD, F., BABAZADEH, D., FANGFANG, X., MODARRESI-GHAZANI, F., WENHUA, L., & XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>;

NIA - NATIONAL INSTITUTE ON AGING. **Alzheimer's Disease Fact Sheet**. Acessado em 05 de agosto de 2021, disponível em: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>;

NIEDZIELSKA, E., SMAGA, I., GAWLIK, M., MONICZEWSKI, A., STANKOWICZ, P., PERA, J., & FILIP, M. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, 53(6), 4094–4125, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>;

OBOH, G., ADEWUNI, T. M., ADEMILUYI, A. O., OLASEHINDE, T. A., & ADEMOSUN, A. O. Phenolic Constituents and Inhibitory Effects of Hibiscus sabdariffa L. (Sorrel) Calyx on Cholinergic, Monoaminergic, and Purinergic Enzyme Activities. **Journal of Dietary Supplements**, 2018. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1406426>;

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1958. **First ten years**. February 2015, 37–41. <https://doi.org/10.1080/00221473.1960.10611277>;

PERRY, V. H., NICOLL, J. A. R., & HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, 6(4), 193–201, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>;

PETERSON, L. J., FLOOD, P. M. (2012). Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. **Mediators of Inflammation**, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/401264>;

- POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C. M., HALLIDAY, G. M., BRUNDIN, P., VOLKMANN, J., SCHRAG, A. E., & LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 3, 1–21, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- PRINCE, M., BRYCE, R., ALBANESE, E., WIMO, A., RIBEIRO, W., & FERRI, C. P. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's and Dementia**, 9(1), 63-75.e2, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>;
- QIAN, L., TAN, K. S., WEI, S.-J., WU, H.-M., XU, Z., WILSON, B., LU, R.-B., HONG, J.-S., & FLOOD, P. M. Microglia-Mediated Neurotoxicity Is Inhibited by Morphine through an Opioid Receptor-Independent Reduction of NADPH Oxidase Activity. **The Journal of Immunology**, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1198>;
- QIN, L., WU, X., BLOCK, M. L., LIU, Y., BREESE, G. R., HONG, J. S., KNAPP, D. J., & CREWS, F. T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **GLIA**, 2007. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>;
- RONDEAU, V., COMMENGES, D., JACQMIN-GADDA, H., & DARTIGUES, J. F. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study. **American Journal of Epidemiology**, 152(1), 59–66, 2000. <https://doi.org/10.1093/aje/152.1.59>;
- SALAU, V. F., ERUKAINURE, O. L., IBEJI, C. U., OLASEHINDE, T. A., KOORBANALLY, N. A., & ISLAM, M. S. Ferulic Acid Modulates Dysfunctional Metabolic Pathways and Purinergic Activities, While Stalling Redox Imbalance and Cholinergic Activities in Oxidative Brain Injury. **Neurotoxicity Research**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00099-7>;
- SANTANA-GÁLVEZ, J., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>;
- SCHELTENS, P., BLENNOW, K., BRETELER, M. M. B., DE STROOPER, B., FRISONI, G. B., SALLOWAY, S., & VAN DER FLIER, W. M. Alzheimer's disease. **The Lancet**, 388(10043), 505–517, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1);
- SHEN, W., QI, R., ZHANG, J., WANG, Z., WANG, H., HU, C., ZHAO, Y., BIE, M., WANG, Y., FU, Y., CHEN, M., & LU, D. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial

- activation and improves survival of dopaminergic neurons. **Brain Research Bulletin**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.04.010>;
- SIMÕES, C. C. DA S. Relações entre as alterações históricas na dinâmica demográfica brasileira e os impactos recorrentes do processo de envelhecimento da população. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2016;
- STEFANELLO, N., SPANEVELLO, R. M., PASSAMONTI, S., PORCIÚNCULA, L., BONAN, C. D., OLABIYI, A. A., TEIXEIRA DA ROCHA, J. B., ASSMANN, C. E., MORSCH, V. M., & SCHETINGER, M. R. C. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>;
- STOKES, J., NOREN, J., & SHINDELL, S. Definition of terms and concepts applicable to clinical preventive medicine. **Journal of Community Health**, 8(1), 33–41, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF01324395>;
- STREIT, W. J., MRAK, R. E., & GRIFFIN, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, 2004. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>;
- TERRY, A. V., & BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2003. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>;
- TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M. W., & INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01786>;
- ULMANN, L., HATCHER, J. P., HUGHES, J. P., CHAUMONT, S., GREEN, P. J., CONQUET, F., BUELL, G. N., REEVE, A. J., CHESSELL, I. P., & RASSENDREN, F. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, 2008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008>;
- VISCOMI, M. T., FLORENZANO, F., CONVERSI, D., BERNARDI, G., & MOLINARI, M. Axotomy dependent purinergic and nitrergic co-expression. **Neuroscience**, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.030>;

ZHANG, Z., ARTELT, M., BURNET, M., TRAUTMANN, K., & SCHLUESENER, H. J.
Lesional accumulation of P2X4 receptor+ monocytes following experimental
traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.09.015>.