



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**YANDRA CARDOSO CARNEIRO**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO PADRONIZADO E CUMARINA DE  
*Amburana cearensis* (CUMARU) EM MODELO DE PARKINSON EM CÉLULAS  
NEURONAIS: AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B**

**FORTALEZA**

**2025**

YANDRA CARDOSO CARNEIRO

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO PADRONIZADO E CUMARINA DE  
*Amburana cearensis* (CUMARU) EM MODELO DE PARKINSON EM CÉLULAS  
NEURONAIS: AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Biotecnologia do  
Centro de Ciências da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida  
Moreira Leal.

Co-orientadora: Dra. Ana Bruna de Araújo.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C291e Carneiro, Yandra Cardoso.

Efeito neuroprotetor do extrato padronizado e cumarina de *Amburana cearensis* (cumarú) em modelo de Parkinson em células neuronais: avaliação da neurotoxicidade e expressão de NF- $\kappa$ B / Yandra Cardoso Carneiro. – 2025.

37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Bruna de Araújo.

1. Doença de Parkinson. 2. Neuroproteção. 3. Cumarina. 4. Fator de transcrição. 5. *Amburana cearensis*. I. Título.

---

CDD 661

YANDRA CARDOSO CARNEIRO

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO PADRONIZADO E CUMARINA DE  
*Amburana cearensis* (CUMARU) EM MODELO DE PARKINSON EM CÉLULAS  
NEURONAIS: AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Biotecnologia do  
Centro de Ciências da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida  
Moreira Leal.

Co-orientadora: Dra. Ana Bruna de Araújo.

Aprovado em: 28 de Fevereiro de 2025

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Gersilene Valente de Oliveira  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Me. Gladyane Santos da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu força e sabedoria para trilhar caminhos que nunca imaginei.

À minha mãe Renata Cardoso, meu porto seguro, que moveu céus e terras para que eu conseguisse chegar aqui hoje. Obrigada por cada incentivo e cada sacrifício feito em meu favor. Essa conquista também é sua.

Aos meus irmãos, Laura Cardoso e Renan Cardoso, meus primeiros amigos, companheiros de vida e de aventuras. Obrigada pelos momentos de cumplicidade e de descontração.

Aos meus avós, que se mantiveram presentes no decorrer de toda caminhada e me ensinaram o valor da honestidade.

Ao Maxwell Lopes, meu noivo e companheiro de vida, que me incentivou em cada desafio e sempre me amparou em cada queda. Obrigada por me lembrar, que mesmo nos momentos difíceis, que eu era capaz.

Aos meus tios e toda a minha família, por serem meu suporte e celebrarem minhas conquistas como se fossem as suas. Em especial ao meu tio Gerardo (*in memoriam*), minha estrelinha, que sempre soube que eu iria chegar aqui.

Aos meus irmãos de coração, Maxwell Cruz, Ellen Araújo e Larissa Braga, meus amigos de longa data e que guardarei para sempre no coração.

À minha segunda família que a Biotecnologia me presenteou, Alana, Ana Carolina, Arlene, Beatriz, Gabrielly Alice, Guilherme, Ianah, Júlia, Laryssa, Levi, Luan, Maria Eduarda, Pedro Victor, Samuel, Thiago e Vitória, que foram rede de apoio durante toda essa graduação, sem vocês nada disso seria possível.

À Professora Luzia Kalyne, por me orientar e guiar meus passos na área profissional. Sua orientação foi fundamental para que essa pesquisa se tornasse realidade.

À Ana Bruna, por me repassar tão bem seus ensinamentos e me ajudar tanto nessa caminhada. Minha profunda gratidão por sua paciência, dedicação e incentivo durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

As minhas amigas de profissão Raysse Mesquita, Isadora Moura e Júlia Souza, obrigada pela parceria e apoio nos momentos mais desafiadores dos experimentos.

A toda equipe CEFAC, pela ajuda, conversas, risadas e deixarem o ambiente de trabalho mais leve.

Aos professores da UFC, por todos os ensinamentos e apoio.

Ao CNPq, a Funcap e a UFC, pelo suporte constante à pesquisa.

À todos que me ajudaram nessa caminhada de forma direta ou indiretamente.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, com projeções indicando que mais de 12 milhões de pessoas serão afetadas até 2040. A DP é caracterizada pela perda progressiva das funções motoras e comportamentais, associada à perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e pela presença de inclusões proteicas denominadas corpos de Lewy, que estão relacionados à neuroinflamação, disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo. Diante das limitações da farmacoterapia atual da DP, que é apenas sintomática, a pesquisa de novos fármacos é imprescindível. Plantas medicinais da caatinga, como *Amburana cearensis* (cumarú) e seus princípios ativos, como a cumarina (CM), têm mostrado efeitos promissores para o controle da neurotoxicidade e neuroinflamação. Diante do exposto, o presente estudo visa investigar o efeito neuroprotetor do extrato seco de *A. cearensis* (ESAC) e da CM, mensurado pela citotoxicidade e a expressão do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B, em modelo de Parkinson em células neuronais (linhagem PC-12). Para tanto, o ESAC foi caracterizado por CLAE (marcadores ativos majoritários – CM =  $35,16 \pm 0,01$  mg/g; ácido vanílico =  $2,02 \pm 0,01$  mg/g; amburosídeo A =  $1,16 \pm 0,01$  mg/g). O efeito do ESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu$ g/mL) e da CM (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu$ g/mL) sobre a neurotoxicidade induzido pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi avaliado através do teste de MTT, e a avaliação da expressão do fator de transcrição pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ B p65) foi realizada por meio da técnica de *western blotting*. Os resultados mostraram que o ESAC (5 - 200  $\mu$ g/mL) e CM (5 - 100  $\mu$ g/mL) não alteraram significativamente a viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle (DMSO 0,1%, veículo, 100% de viabilidade). O pré-tratamento das células PC-12 com ESAC (10  $\mu$ g/mL) resultou em uma redução de até 20% na neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA (25  $\mu$ g/mL), em comparação com o grupo 6-OHDA+DMSO 0,1% ( $48,8 \pm 5,0\%$ ). Resultado semelhante foi observado para a CM. A exposição das células PC-12 à 6-OHDA aumentou a expressão de NF- $\kappa$ B p65 em relação ao grupo não tratado (DMSO 0,1%). Porém, o tratamento com ESAC (10 e 25  $\mu$ g/mL) inibiu em até 29% o aumento da expressão do NF- $\kappa$ B p65 induzido pela 6-OHDA, enquanto o tratamento com a CM (5 e 10  $\mu$ g/mL) alcançou redução de até 39% na expressão da via de NF- $\kappa$ B p65. O estudo permitiu o emprego do modelo de Parkinson em células neuronais dopaminérgicas padronizado anteriormente pelo nosso laboratório, com determinação inédita do efeito neuroprotetor do ESAC e da CM, que parece estar associado à redução do microambiente inflamatório via do NF- $\kappa$ B p65.

**Palavras-chave:** doença de Parkinson; *Amburana cearensis*; neuroproteção; cumarina; fator de transcrição.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Doença de Parkinson: fisiopatologia e farmacoterapia atual.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1 Farmacoterapia .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Modelos experimentais da Doença de Parkinson: células neuronais .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Plantas medicinais da caatinga no tratamento da doença de Parkinson: <i>Amburana cearensis</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Delineamento Experimental .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Materiais de estudo .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.1 <i>Amburana cearensis</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.2 <i>Cumarina</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.3 <i>Outros materiais</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Caracterização do extrato seco de <i>Amburana cearensis</i> - ESAC.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Células.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5 Avaliação da citotoxicidade e efeito neuroprotetor em cultura de células neuronais (linhagem PC-12) .....</b>	<b>20</b>
<b>4.6 Construção da curva dose-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF-<math>\kappa</math>B em células neuronais PC-12 .....</b>	<b>20</b>
<b>4.7 Efeito do ESAC e CM sobre a via de sinalização intracelular do NF-<math>\kappa</math>B em células PC-12 expostas à 6-OHDA .....</b>	<b>20</b>
<b>4.7.1 <i>Preparo da amostra</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>4.7.2 <i>Extração e quantificação de proteínas</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4.7.3 <i>Análise de western blotting</i> .....</b>	<b>21</b>

4.8 Análise Estatística .....	22
5. RESULTADOS .....	23
5.1 ESAC e CM não alteram o metabolismo de células PC-12 através do teste do MTT .....	23
5.2 ESAC e CM apresentam efeito neuroprotetor sobre a neurotoxicidade da 6-OHDA em células neuronais (linhagem PC-12) .....	24
5.3 Padronização da curva dose-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF- $\kappa$ B em células neuronais PC-12 .....	26
5.4 ESAC e CM reduziram a fosforilação da via de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B induzida pela 6-OHDA em células neuronais (linhagem PC-12) .....	27
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES .....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Parkinson: fisiopatologia e farmacoterapia atual

Doenças neurodegenerativas acometem cerca de 1% da população mundial, sendo que a maioria dos casos ocorre em pessoas com mais de 60 anos, com a doença de Alzheimer ocupando o primeiro lugar, seguida pela doença de Parkinson (DP) (Sprenger; Poewe, 2013). Essas doenças afetam entre 200 mil e 300 mil brasileiros, sendo que 10% dos casos ocorrem em pessoas com menos de 50 anos, de acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS). Estima-se que o número de casos ultrapasse 12 milhões até 2040, devido a fatores como o elevado nível de industrialização e o envelhecimento da população (Yang *et al.*, 2020).

A neurodegeneração é caracterizada pela perda progressiva de neurônios no sistema nervoso central (SNC) e inclui doenças como Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e Esclerose Múltipla (EM). A evolução dessas doenças frequentemente é acompanhada por alterações comportamentais e perda motora, principalmente a DP (Glass *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2019).

A DP é caracterizada por rigidez muscular, tremores em repouso, instabilidade postural e bradicinesia. Ela é causada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, o que reduz a produção de dopamina (DA), um neurotransmissor essencial para a comunicação entre neurônios nos núcleos da base. Essa deficiência dopaminérgica na via nigroestriatal é responsável pelos sintomas motores típicos da doença (Benazzouz *et al.*, 2014). Além desses fatores, a DP é associada à presença de aglomerados de proteínas anormais no interior de células neuronais, conhecido como corpos de Lewy. Esses corpos são inclusões citoplasmáticas compostas por mais de 90 proteínas, com destaque para a  $\alpha$ -sinucleína e a ubiquitina. O acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína podem comprometer as mitocôndrias e a homeostase do cálcio, propagando dessa forma a neurodegeneração. Os corpos de Lewy também afetam outras estruturas, como os gânglios da base (estriado e substância negra), responsáveis pelos movimentos. A degeneração dessas áreas ocasiona em sintomas motores, como a rigidez, tremores e bradicinesia (Neves; Almeida; Cavadas, 2016; Fu, 2015).

A neuroinflamação acontece como uma resposta imunológica do SNC, mediada principalmente por astrócitos e microglias. Quando benéfica, a resposta funciona promovendo o reparo do tecido danificado, mas quando de forma exacerbada, contribui para o

desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A barreira hematoencefálica (BHE) é responsável pela regulação da entrada de células imunes do SNC, mas um distúrbio causado no tecido, permite a instalação de células do sistema imune periférico, como linfócitos e macrófagos, intensificando a inflamação. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , penetram a BHE e ativam o sistema imune, exacerbando a resposta neuroinflamatória. A neuroinflamação prolongada resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção mitocondrial e o acúmulo de substâncias proteicas, como  $\alpha$ -sinucleína. A agregação dessa proteína forma corpos de Lewy, que promovem danos sinápticos e progressão da neurodegeneração (Glass *et al.*, 2010).

Na DP, assim como na doença de Alzheimer e na epilepsia, observa-se um aumento significativo na quantidade de mediadores inflamatórios nas estruturas neurais, mostrando que o processo inflamatório desempenha um papel crucial na fisiopatologia da doença (Hirsch *et al.*, 2009).

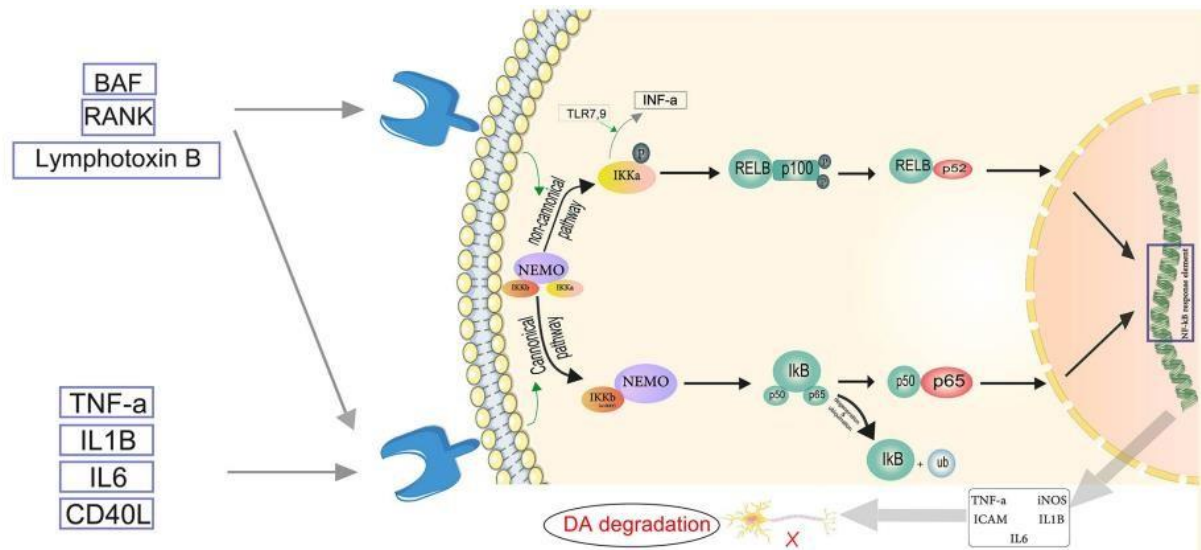
A inflamação, juntamente com respostas metabólicas mitocondriais, pode gerar tanto moléculas de radicais livres altamente reativas, quanto moléculas estáveis, induzindo o estresse oxidativo, um dos mecanismos patológicos subjacentes à DP. Esse processo ocorre quando há um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, e está relacionado às EROs, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e às vias de sinalização do óxido nítrico (NO). Nesse contexto, o aumento das ERO e ERN está diretamente associado à redução da disponibilidade de NO biodisponível (Santos *et al.*, 2022).

Diversos fatores estão envolvidos na disfunção mitocondrial, como mutações genéticas, mutações no DNA mitocondrial e liberação em excesso de EROs, estando todos estes relacionados com a via de inibição do complexo I. A neuroinflamação decorre de lesões na região cerebral, que pode ocorrer por motivos de EROs, NO, quimiocinas e citocinas, em que a geração em grandes quantidades de moléculas neurotóxicas agrava o quadro da neuroinflamação (Huang *et al.*, 2015).

Uma das vias ativadas no processo inflamatório e também responsável pelo controle das respostas inflamatórias é o fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B p65) que é ativada pela sua fosforilação e logo em seguida a degradação de inibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Posteriormente, o NF- $\kappa$ B p65 é transportado para o núcleo, promovendo assim a expressão de genes pró-inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-6, IL-1 $\beta$ ), dentre

outras, tornando a indução da inflamação neuronal um modelo importante para o estudo de prováveis alvos terapêuticos na redução da morte neuronal (Olajide *et al.*, 2013).

**Figura 1** - Neuroinflamação mediada por NF- $\kappa$ B e sua relação com a degeneração dopaminérgica na doença de Parkinson



Fonte: Fathi *et al.*, 2022. As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e CD-40L ativam a via canônica, onde um inibidor de quinase de  $\kappa$  (IKK)  $\beta$  (ou IKK $\gamma$ ) é necessário para a ativação do NF- $\kappa$ B. A fosforilação do I $\kappa$ B ocorre pela IKK $\beta$ . A subunidade de regulação do complexo IKK atua como um modulador fundamental do NF- $\kappa$ B (NEMO). No citosol, a I $\kappa$ B é degradada pelos proteassomas, e o heterodímero fosforilado do NF- $\kappa$ B (p50-p65) é transferido para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta do NF- $\kappa$ B. Dessa maneira, mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS e ICAM, são ativados e atuam na estimulação dos neurônios dopaminérgicos (DA). Na via não canônica, o NEMO estimula a fosforilação IKK- $\alpha$  e induz tanto a destruição proteassomal quanto o processamento proteassomal de p100, resultando na formação do heterodímero ativo p52-RELB. A IKK $\alpha$  estimula a produção INF- $\alpha$ , desencadeada pelos receptores TLR7 e TLR9. O heterodímero ativo p52-RELB entra no núcleo e se liga ao elemento de resposta do NF- $\kappa$ B, regulando a expressão de fatores pró-inflamatórios.

### 1.1.1 Farmacoterapia

A farmacoterapia atual para o tratamento da DP tem auxiliado na atenção aos pacientes, mas com limitações importantes, incluindo o fato de ser sintomática e provocar efeitos adversos importantes.

As formas de tratamentos atuais para a DP não são capazes de impedir a neurodegeneração, de maneira que funcionam aumentando a sinalização nas vias dopaminérgicas por meio da inibição da monoamina oxidase B (selegilina), reposição de dopamina (levodopa), da catecol-O-metiltransferase (entacapona) e de agonistas dopaminérgicos (ropinirol, pramipexol e

rotigotina), obtendo redução dos sintomas motores (Erkkinen; Kim; Geschwind, 2018). Um dos medicamentos mais utilizados para tratar sintomas motores é a levodopa, um precursor da dopamina que atua nos receptores pós-sinápticos, ativando a sinalização dopaminérgica nos gânglios da base, entretanto, ele causa em longo prazo efeitos adversos, como o aumento do estresse oxidativo, hipotensão e náuseas, ocasionando também em instabilidade motora. A levodopa sofre conversão em dopamina nos neurônios através da enzima DOPA descarboxilase. Entretanto, a dopamina possui alta reatividade e pode ser oxidada espontaneamente ou por enzimas, como monoamina oxidase (MAO), gerando assim o excesso de radicais livres e o aumento do estresse oxidativo (Yacoubian, 2017).

Existem medicamentos que são utilizados em combinação com a levodopa, como a selegilina e o prolopa, cujo o mecanismos de ação envolve a inibição da MAO ou da catecol-o-metiltransferase (COMT), resultando no bloqueio das enzimas envolvidas na decomposição da levodopa e da dopamina, com intuito de melhorar sua eficácia, mas que potencializam os efeitos adversos da levodopa. Tratamentos envolvendo procedimentos cirúrgicos também são uma opção, mas nenhum é capaz de retardar a neurodegeneração (Hayes, 2019).

O entendimento da DP e sua fisiopatologia é fundamental para compreender os mecanismos subjacentes à morte neuronal, o que, por sua vez, contribui para o desenvolvimento de modelos experimentais que são essenciais na pesquisa de novos fármacos (Dauer *et al.*, 2003).

## **1.2 Modelos experimentais da Doença de Parkinson: células neuronais**

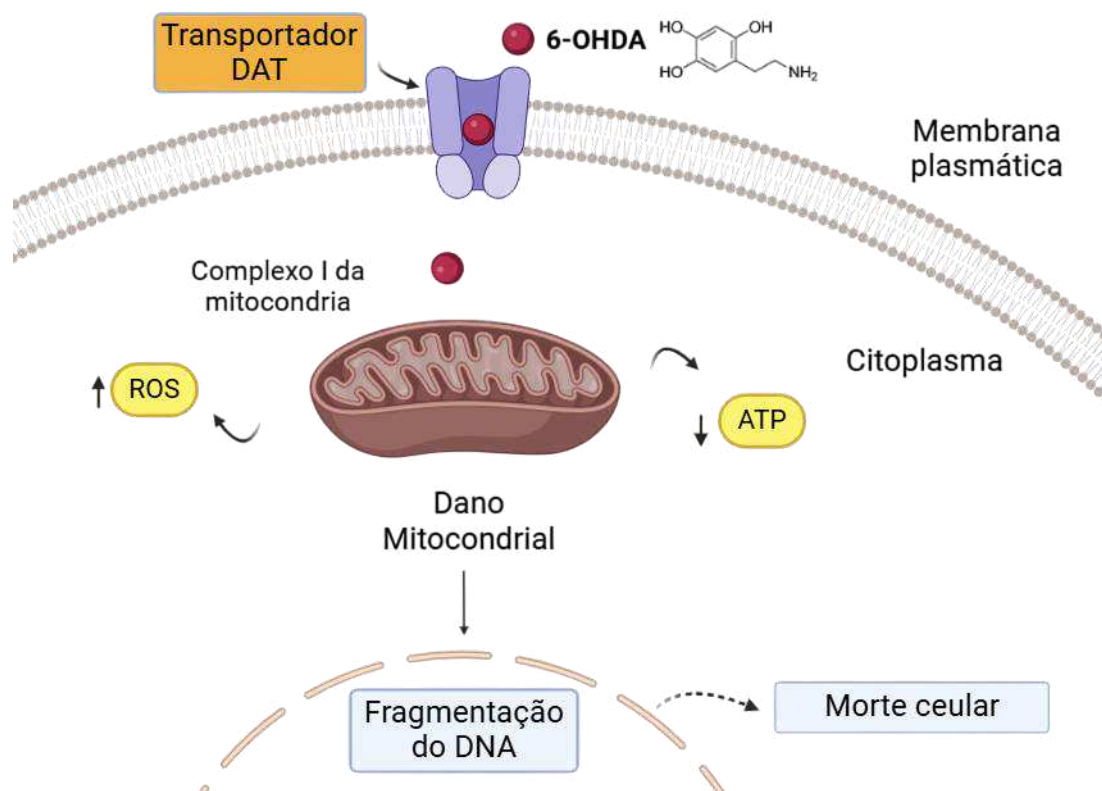
Estudos anteriores (Exner *et al.*, 2012) permitiram descrever parte dos mecanismos relacionados à neurodegeneração presente na instalação de evolução da DP, e foram identificadas algumas neurotoxinas capazes de mimetizar a doença *in vivo* e *in vitro*, como a 6-OHDA.

A utilização de produtos químicos que induzem a destruição seletiva de neurônios dopaminérgicos, principalmente por meio da estimulação do estresse oxidativo, tem sido extremamente utilizada e continua sendo uma ferramenta de suma importância para o estudo da DP. A 6-OHDA tem a capacidade de entrar nos neurônios dopaminérgicos por meio do transportador de dopamina (DAT), iniciando o processo de degeneração celular ao combinar disfunção mitocondrial com estresse oxidativo. Uma vez dentro das células, a 6-OHDA é oxidada pela monoamina oxidase A (MAO-A), formando quinonas e liberando EROs, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esses processos resultam em morte neuronal devido aos danos causados ao material genético e às proteínas celulares. Além disso, essa toxina é capaz de

interagir com o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, interrompendo o processo de respiração celular (Kabuto; Yamanushi, 2011; Baltazar; Flores; Olivo, 2017).

O estresse oxidativo em células neuronais ativa vias inflamatórias importantes, como a via do NF- $\kappa$ B, ao qual sua ativação pela 6-OHDA é mediada por processos neuroinflamatórios. Após ser capturada pelos receptores dopaminérgicos, a 6-OHDA gera espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos celulares e ativam vias de sinalização intracelular. Esse processo leva à fosforilação de proteínas-chave, como IKK $\alpha/\beta$  e I $\kappa$ B $\alpha$ , promovendo a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde ativa a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Wan *et al.*, 2023).

**Figura 2** – Mecanismo de ação da 6-OHDA



Fonte: O autor (2025). A toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) tem sido utilizada como modelo experimental da DP. Essa neurotoxina utiliza o transportador de dopamina (DAT) para entrar nos neurônios dopaminérgicos. A 6-OHDA pode induzir a diminuição da produção de ATP assim como ativar uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Modelos *in-vitro* são frequentemente utilizados para identificar e selecionar os compostos com os melhores resultados terapêuticos. Para simular os processos moleculares e bioquímicos envolvidos na neurodegeneração da Doença de Parkinson (DP), foram criados modelos *in vitro* que reproduzem as características da neuroinflamação associada à doença (Blesa *et al.*, 2014).

Um dos modelos *in vitro* que tem sido empregado com sucesso nas pesquisas farmacológicas é a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células neuronais - linhagem PC-12. Essas células são oriundas de feocromocitoma de rato transplantável e normalmente utilizadas para estudar a morte de células neuronais, testar o potencial efeito neuroprotetor de novos fármacos e realizar análises de neuroinflamação, neurotoxicidade e neuroproteção. Essas células possuem a capacidade de sintetizar, liberar, captar e armazenar catecolaminas, ao qual a principal é a dopamina (Benita Wiatrak *et al.*, 2020). O modelo celular auxilia muito na triagem de fármacos e na descrição de mecanismos de ação celular e molecular.

O nosso laboratório tem investido na padronização de modelos celulares de inflamação em células do sistema imune do sistema nervoso central (células microgliais) e células neuronais - linhagem PC-12 (Araújo *et al.*, 2022; Mesquita, 2024). Nesse processo, foi padronizado o modelo 6-OHDA em células PC-12, que foi então empregado na triagem de biomateriais promissores oriundos de plantas medicinais do bioma caatinga como *A. cearensis*.

### **1.3 Plantas medicinais da caatinga no tratamento da doença de Parkinson:**

#### ***Amburana cearensis***

Na busca por alternativas para o tratamento, ou até mesmo prevenção da DP, as plantas medicinais surgem como fontes promissoras para o desenvolvimento de possíveis fármacos. O uso de plantas no tratamento de doenças é uma prática que remonta a várias décadas, resultando na descoberta de inúmeros medicamentos amplamente utilizados atualmente, tanto na forma de extratos ativos quanto de fitoterápicos e/ou fitofármacos (Newman *et al.*, 2007).

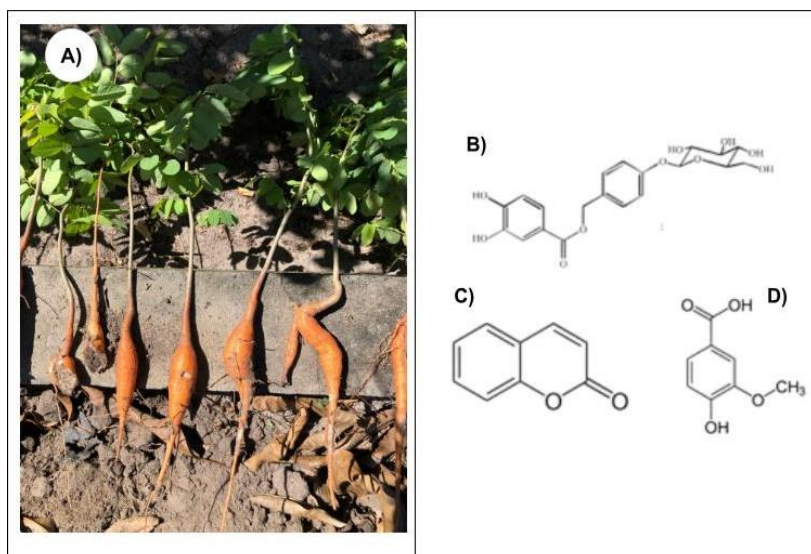
A *Amburana cearensis* A. C. Smith (Fabaceae), também conhecida como "cumaru", é uma árvore encontrada predominantemente na caatinga. Ela contém diversas moléculas bioativas, como CM, ácido vanílico (AV), flavonoides e glicosídeos fenólicos, como o amburosídio A e B (AMB) (Almeida *et al.*, 2010). *A. cearenses* e seus ativos, como a CM, o AV e o AMB, têm demonstrado atividades antioxidante e anti-inflamatória em diversos estudos (Pereira *et al.*, 2017; 36 Leal *et al.*, 2011; Amaral, 2017; Pereira *et al.*, 2009).

Pesquisas realizadas anteriormente destacam as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da *A. cearensis* devido a presença de compostos fenólicos, como flavanoides e cumarina. Estes compostos reduzem o estresse oxidativo e a inflamação celular por meio da neutralização dos radicais livres (Amaral, 2017). Além disso, o extrato mostrou efeito inibitório sobre citocinas pró-inflamatórias, evidenciando seu potencial terapêutico na modulação da

resposta inflamatória. Estudos demonstraram que o potencial terapêutico de *A. cearensis* se deve principalmente à presença de compostos como a CM (Marinho *et al.*, 2004). O estudo também aponta que o extrato da planta pode atuar retardando a senescência celular e ajudando no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas (Canuto *et al.*, 2014).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa investigaram as diferentes formas de cultivo de *A. cearensis*, avaliando seu perfil de crescimento e as condições ideais (Canuto e Silveira, 2010). O uso amplamente reconhecido na forma de xarope, tem contribuído para a redução da disponibilidade, levando ao risco de extinção da espécie. Dessa forma, investir no cultivo dessa espécie tem se tornado uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas terapias.

**Figura 3** - *Amburana cearensis* cultivada (A) e seus ativos principais amburosídeo A (B), cumarina (C) e ácido vanílico (D)



Fonte: Amaral (2017) adaptado.

Pesquisas realizadas por Leal e colaboradores (2003a) mostraram que o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *A. cearensis* silvestre (EHA) (500 mg/Kg, v.o) não apresentou alterações significativas sobre os parâmetros analisados, como bioquímicos, hematológicos e reprodutivos em estudos de toxicidade pré-clínica (dose única e doses repetidas) por via oral em ratos *wistar* (machos e fêmeas). O estudo também demonstrou que o extrato da espécie cultivada apresenta atividade farmacológica semelhante ao extrato da espécie silvestre.

No trabalho de Amaral (2017) observou-se que o ESAC cultivado por 7 meses apresentou como constituintes químicos majoritários CM, amburosídeo A (AMB) e AV, semelhante ao encontrado no extrato obtido da casca da árvore silvestre. Este estudo demonstrou o efeito do extrato seco padronizado em modelo de asma alérgica exacerbada, que resultou na redução de citocinas, EROs e na modulação da resposta de células inflamatórias.

Diversos estudos relatam os efeitos farmacológicos do extrato e dos princípios ativos de *A. cearensis*. Tanto os extratos hidroalcoólicos, quanto os etanólicos, apresentam propriedades antiedematosas e antinociceptivas em modelos *in vivo*, que resultaram na redução do edema e dor (Leal *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009). O extrato hidroalcoólico e a CM também tiveram ação imunomoduladora em camundongos sensibilizados com ovoalbumina (MARINHO *et al.*, 2004) e mostrou efeito anti-inflamatório, reduzindo a migração de neutrófilos causados pelo N-formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP).

Pesquisas anteriores do nosso grupo de pesquisa (Leal *et al.*, 2005) demonstraram que os ativos da planta, como CM, AMB e AV, também podem atuar em células do sistema nervoso. O AMB demonstrou efeito neuroprotetor em modelo de neurotoxicidade induzido por 6-OHDA em células do mesencéfalo. Além disso, estudos recentes (DE ARAÚJO *et al.*, 2022) demonstraram que o ESAC, é capaz de inibir a via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), especialmente a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) em células microgliais ativadas por lipossacarídeo (LPS).

Diante da atividade anti-inflamatória e neuroprotetora previamente demonstrada pelo extrato de *Amburana cearensis* e seus ativos, o presente estudo buscou avaliar o efeito neuroprotetor do extrato padronizado (ESAC) e de seu ativo, CM, em um modelo experimental de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em células neuronais da linhagem PC-12. Para isso, foram utilizados como marcadores a avaliação da viabilidade celular e a análise da expressão do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B.



## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos indicam que entre 8,5 milhões e 10 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela DP, com uma prevalência crescente, especialmente entre a população idosa. No entanto, também há uma parcela significativa de casos em indivíduos mais jovens, o que amplia ainda mais o impacto dessa doença neurodegenerativa (site Parkinson's Foundation, 2018). Os tratamentos atuais para a doença são limitados ao controle dos sintomas motores e frequentemente apresentam efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes. Além disso, esses tratamentos não conseguem interromper ou retardar o processo de neurodegeneração, o que é um grande desafio no manejo da doença. Nesse contexto, novas abordagens terapêuticas são essenciais, principalmente para impedir a neurodegeneração (neurônios dopaminérgicos), que está associado aos *déficits* comportamentais e motores, e/ou para retardar a neurodegeneração, por exemplo, via controle da neuroinflamação que tem um papel importante na instalação e progressão da DP.

Considerando os dados existentes sobre a DP e sua relação com a neuroinflamação, extratos e ativos de *A. cearensis* surgem como materiais promissores para o tratamento da doença. O extrato seco de *A. cearensis* cultivada (ESAC) e seus princípios ativos, como a cumarina (CM), demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em modelos experimentais em células microgliais (sistema imune do SNC), células mesencefálicas e em ratos. Contudo, ainda são limitadas as informações sobre o efeito do ESAC no SNC. Diante disso, é de extrema importância avançar nas pesquisas sobre os efeitos de *A. cearensis*, incluindo a análise mais detalhada de seus alvos moleculares. Esse estudo pode contribuir para o desenvolvimento de terapias inovadoras e eficazes para o tratamento da DP, trazendo novos recursos para o manejo da doença e melhorando a qualidade de vida dos pacientes afetados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade neuroprotetora do extrato padronizado de *Amburana cearensis* e ativo (cumarina), empregando como marcadores a avaliação da viabilidade celular e a expressão de fator de transcrição inflamatório - NF- $\kappa$ B.

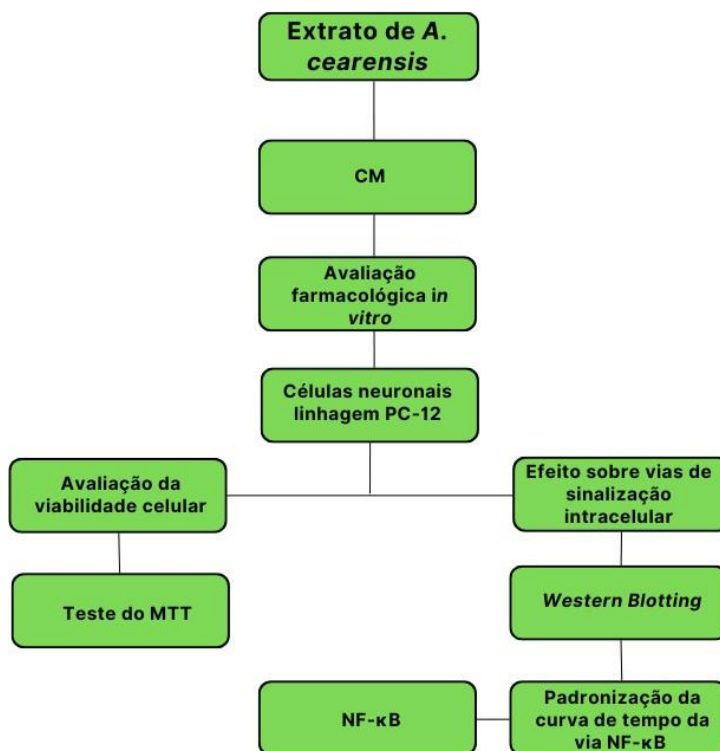
#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do ESAC e cumarina sobre a viabilidade de células PC-12;
- Avaliar o efeito do ESAC e de seu ativo, cumarina, sobre a citotoxicidade induzida por 6-OHDA através do teste do MTT em células PC-12;
- Construir uma curva dose-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF- $\kappa$ B, e selecionar a condição experimental de escolha para avaliar o ESAC e a cumarina;
- Investigar o efeito do ESAC e da cumarina na via de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B em células PC-12 expostas à 6-OHDA.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

**Figura 4** - Fluxograma demonstrando o delineamento do projeto



Fonte: elaborado pela autora (2025).

### 4.2 Materiais de estudo

#### 4.2.1 *Amburana cearensis*

Planta coletada no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (NEPAU) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Número de exsicata: 52618 e 52619. Cadastro do SisGen: A5A3C7B.

#### 4.2.2 *Cumarina*

Foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich, EUA. Grau de pureza: > 99%.

#### 4.2.3 Outros materiais

As demais substâncias químicas, como dimetilsulfóxido (DMSO), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), Trypan Blue, 3-(4,5- dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich, EUA.

Soro fetal bovino (FBS), meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) foram comprados da Gibco by Life Technologies, EUA. As células pheochromocytoma (PC-12) de camundongo foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. O anticorpo anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65 foi obtido da Cell Signaling Technologies. O anticorpo anti- $\beta$ -actina foi obtido da Abcam Cambridge, Reino Unido. Anticorpos secundários anti-camundongo foi obtido de Bio-Rad Laboratories, CA, EUA e anti-coelho foi obtido de Sigma-Aldrich, Nova York, EUA.

#### 4.3 Caracterização do extrato seco de *Amburana cearensis* - ESAC

A produção e caracterização do extrato seco de *A. cearensis* foi realizada segundo metodologia desenvolvida no nosso laboratório. As plantas foram cultivadas, com secagem de 48h e moída, sendo utilizadas as partes aéreas para produção do extrato. A extração deu-se pelo método de maceração por 24 h com etanol conforme previamente determinado (LIMA, 2013).

O extrato hidroetanólico foi submetido à secagem por *spray-dryer*, e análise por CLAE mostrou que a CM é o marcador majoritário ( $35,16 \pm 0,01$  mg/g), seguido pelo AV ( $2,02 \pm 0,01$  mg/g) e AMB ( $1,16 \pm 0,01$  mg/g). A caracterização química foi realizada em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters, USA), com determinação do perfil cromatográfico e do teor de marcadores ativos (CM, AV e AMB).

#### 4.4 Células

As células de feocromocitoma de rato (linhagem PC-12) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS. Foram cultivadas até 70-80% de confluência e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5 Avaliação da citotoxicidade e efeito neuroprotetor em cultura de células neuronais (linhagem PC-12).**

Para avaliar a citotoxicidade, foi realizado o ensaio de MTT, amplamente utilizado na pesquisa de citotoxicidade de novas drogas, pois avalia essencialmente a função metabólica das células por meio da redução do sal de MTT a formazan, conversão mediada pelo complexo enzimático succinato-tetrazol redutase, presente na cadeia respiratória mitocondrial (MOSMANN, 1983). Sendo assim, as células neuronais PC-12 ( $2,5 \times 10^4$  células/mL) foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram pré-tratadas com concentrações crescentes de ESAC (10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ), CM (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), com o grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1%) e Triton X-100 (0,1%, padrão citotóxico). Também foram avaliados os efeitos dessas drogas após exposição à 6-OHDA, utilizando a quercetina (25  $\mu\text{M}$ ), como droga padrão. Após 15 minutos do tratamento, as células foram então expostas à 6-OHDA (25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas. Posteriormente, as células PC-12 foram incubadas com MTT por 3 horas, centrifugadas a 800 g e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado DMSO puro para a solubilização do sal de formazan. A absorbância foi medida em uma leitora de microplacas a 560 nm.

#### **4.6 Construção da curva dose-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF- $\kappa$ B em células neuronais PC-12**

Para avaliar a ativação da via do NF- $\kappa$ B p65 induzida por 6-OHDA, foi realizada uma curva dose-resposta (30, 45 e 60 minutos) com o objetivo de monitorar o aumento na fosforilação dessa via em células PC-12. As células neuronais PC-12 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas ao controle (DMSO 0,1%- veículo da droga) por 15 minutos, e em seguida à 6-OHDA por 30, 45 e 60 minutos. A expressão da via do NF- $\kappa$ B p65 foi, então, avaliada de acordo com os procedimentos descritos no item 4.7.

#### **4.7 Efeito do ESAC e CM sobre a via de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B em células PC-12 expostas à 6-OHDA**

##### ***4.7.1 Preparo da amostra***

Visando investigar o efeito do ESAC e CM sobre a via de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B p65 as células neuronais PC-12 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas ao ESAC (10 e 25  $\mu$ g/mL), CM (5 e 10  $\mu$ g/mL), quercetina (QUE) (25  $\mu$ M), e DMSO 0,1% (veículo da droga) por 15 minutos. Em seguida, exposta à 6-OHDA (25  $\mu$ g/mL), durante 60 min.

#### 4.7.2 Extração e quantificação de proteínas

Para a obtenção do homogenato proteico total, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e, em seguida, extraídas da placa de 6 poços utilizando o tampão de ensaio radioimunoprecipitação (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; deoxicolato de sódio 0,25%; NaF 10  $\mu$ g/mL; EDTA 1 mM), contendo o inibidor de protease (1:20) (P2714, Sigma-Aldrich, New York, EUA), o inibidor de fosfatase (1:50) (ab201112, Abcam®, Cambridge, Reino Unido) e PMSF (1:50). Após a extração, o conteúdo das placas foi cuidadosamente deslocado com o *cell lifter* e transferido para tubos *ependorf*. O homogenato foi então centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, a 4°C, em ultracentrífuga. O *pellet* contendo os restos celulares foi descartado, e o sobrenadante rico em proteínas foi armazenado a -80°C.

#### 4.7.3 Análise de western blotting

Uma quantidade das amostras (30  $\mu$ g) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 7,5-10% (120 V, 90 minutos) e, em seguida, transferida para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (70 V, 2 horas). Após esse período, as membranas foram bloqueadas com Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários: anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536, #3033S) (1:1000) e anti- $\beta$ -actina (ab8226) (1:5000). Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20), e as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-coelho 1:5000, SAB3700956, ou anti-camundongo 1:5000, #170-6516) por 2 horas à temperatura ambiente. A visualização das bandas de proteínas foi realizada utilizando o reagente de quimioluminescência (ECL) (Western Blot Clarity™ ECL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e o sistema de imagem ChemiDoc MP (Bio-Rad, EUA) (ZHAO *et al.*, 2018). O nível proteico foi analisado com o software ImageLab 6 (Bio-Rad, EUA) e normalizado com  $\beta$ -actina.

#### **4.8 Análise Estatística**

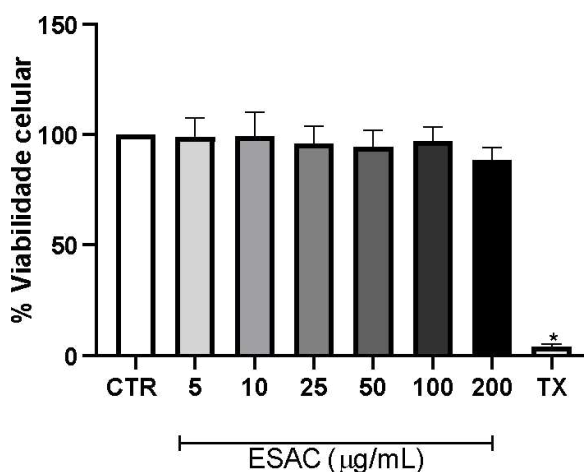
As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni. Para os ensaios relacionados ao efeito da via do NF- $\kappa$ B, foi utilizado o teste t de Student. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESAC e CM não alteram o metabolismo de células PC-12 através do teste do MTT

O efeito do ESAC e CM sobre a viabilidade celular foi avaliado pelo teste de MTT, conforme apresentado na **Figura 5 e 6**, respectivamente. A adição de concentrações crescentes do ESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) não diminuiu de forma significativa a viabilidade de células PC-12 ( $99,0 \pm 3,2\%$ ;  $99,3 \pm 4,2\%$ ;  $96,0 \pm 3,1\%$ ;  $94,4 \pm 3,4\%$ ;  $97,3 \pm 2,4\%$ ;  $88,7 \pm 3,3\%$ , respectivamente) quando comparado com o grupo controle 0,1% de DMSO - veículo para dissolução do ESAC e CM (100% de viabilidade), assim como a CM (5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ), que também não alterou a viabilidade celular ( $93,3 \pm 0,7\%$ ;  $93,0 \pm 7,8\%$ ;  $95,0 \pm 7,0\%$ ;  $97,0 \pm 6,3\%$ ;  $88,3 \pm 4,6\%$ , respectivamente) quando comparado ao grupo controle (100% de viabilidade).

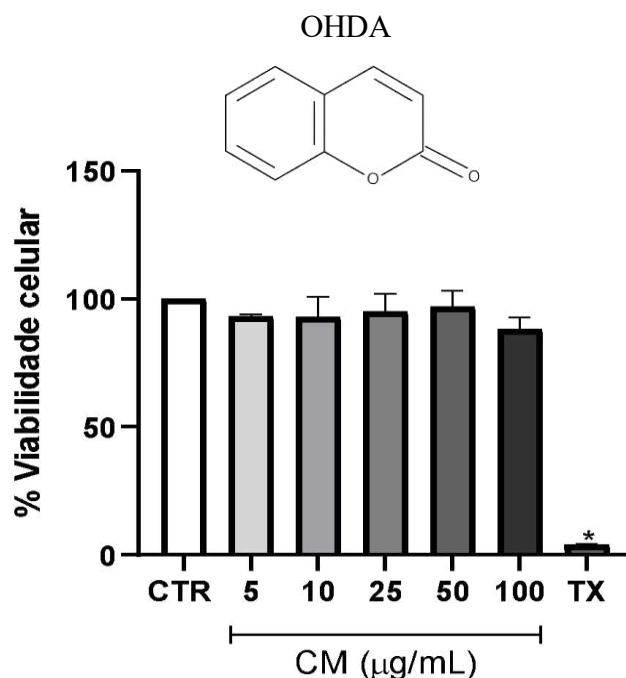
**Figura 5** - Efeito do ESAC sobre células neuronais de linhagem PC-12 na ausência de 6-OHDA



**Legenda:** Efeito do ESAC (5-200  $\mu\text{g/mL}$ ) na viabilidade de células PC-12 medidas através do ensaio do MTT. CTR: DMSO 0,1% (veículo da droga); TX: Triton X-100 0,1%; Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=3) ( $p < 0,05$  – one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni). n = 3/grupo.



**Figura 6** - Efeito da CM sobre células neuronais de linhagem PC-12 na ausência de 6-

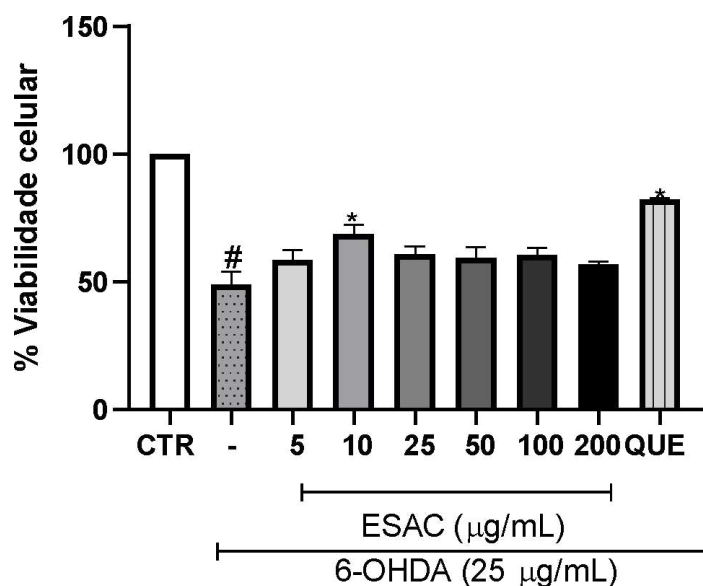


**Legenda:** Efeito da CM (5-100 µg/mL) na viabilidade de células PC-12 medidas através do ensaio do MTT. CTR: DMSO 0,1% (veículo da droga); TX: Triton X-100 0,1%; Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=3) ( $p < 0,05$  – one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni). n = 3/grupo.

## 5.2 ESAC e CM apresentam efeito neuroprotetor sobre a neurotoxicidade da 6-OHDA em células neuronais (linhagem PC-12)

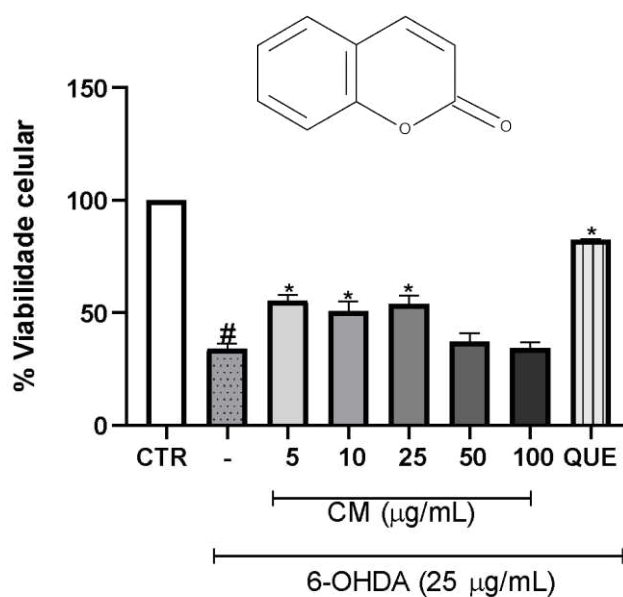
O pré-tratamento com ESAC (5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) foi realizado, mas somente a concentração de 10 µg/mL apresentou aumento significativo na viabilidade celular (Abs 560nm:  $68,7 \pm 3,6\%$ ) quando comparado ao grupo 6-OHDA (Abs 560nm:  $48,9 \pm 5,1\%$ ). O ESAC (10 µg/mL) não apresentou alterações significativas em relação a QUE (25 mM), padrão utilizado, quando comparados ( $68,7 \pm 3,6\%$ ;  $82,3 \pm 0,3\%$ , respectivamente). De forma semelhante, a CM nas concentrações de 5, 10 e 25 µg/mL aumentou significativamente a viabilidade celular (Abs 560nm:  $55,3 \pm 2,6\%$ ;  $50,5 \pm 4,4\%$ ;  $53,7 \pm 3,9\%$ , respectivamente), quando comparado com o grupo 6-OHDA (Abs 560nm:  $34,0 \pm 2,2\%$ ). O flavonoide quercetina (25 mM), usado como droga padrão, também aumentou a viabilidade celular (Abs 560nm:  $43,2 \pm 1,6\%$ ) em relação ao grupo 6-OHDA (Abs 560nm:  $43,2 \pm 1,6\%$ ). Esses resultados foram utilizados como parâmetro para definir as concentrações a serem utilizadas na etapa subsequente do estudo.

**Figura 7** – Efeito do ESAC sobre células neuronais de linhagem PC-12 na presença de 6-OHDA



**Legenda:** Efeito do ESAC (5-200 µg/mL) na viabilidade de células PC-12 medidas através do ensaio do MTT. CTR: DMSO 0,1% (veículo da droga); Que: Quercetina 25 µM; Os resultados estão expressos como média ± E.P.M (n=3) (p<0,05 – one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni). n = 3/grupo. <sup>#</sup> vs CTR (p< 0,05). <sup>\*</sup> vs 6-OHDA (p<0,05).

**Figura 8** – Efeito da CM sobre células neuronais de linhagem PC-12 na presença de 6-OHDA

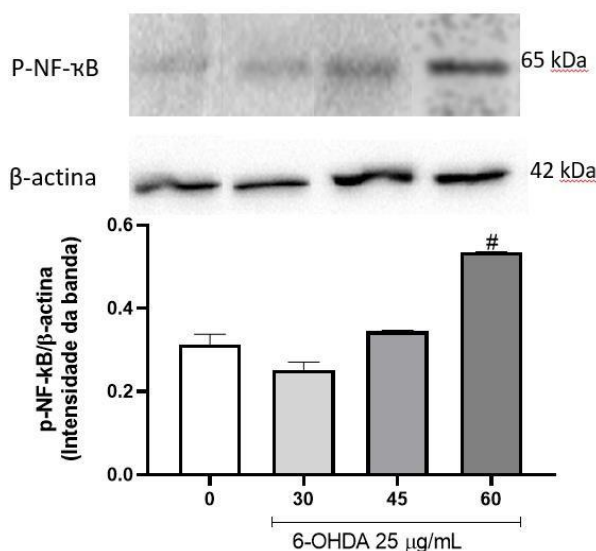


**Legenda:** Efeito da CM (5-200  $\mu\text{g/mL}$ ) na viabilidade de células PC-12 medidas através do ensaio do MTT. CTR: DMSO 0,1% (veículo da droga); Que: Quercetina 25  $\mu\text{M}$ ; Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) ( $p < 0,05$  – one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni). n = 3/grupo. # vs CTR ( $p < 0,05$ ). \* vs 6-OHDA ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Padronização da curva dose-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF- $\kappa$ B em células neuronais PC-12

A ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B regula diversos mecanismos celulares e está fortemente associada à produção de mediadores inflamatórios (LAWRENCE *et al.*, 2009). A **Figura 9** apresenta a padronização da curva tempo-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão da via NF- $\kappa$ B, fator de transcrição de mediadores inflamatórios. Foram investigados três tempos (30, 45 e 60 minutos) de análise da expressão do NF- $\kappa$ B após à exposição à 6-OHDA. Dentre os tempos investigados, somente a exposição das células à 6-OHDA por 60 minutos (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,54 \pm 0,01$ ) resultou em um aumento significativo na fosforilação da via NF- $\kappa$ B, quando comparado ao grupo controle (tempo 0, células não tratadas/ não expostas à 6-OHDA) (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,02$ ), sendo esse tempo selecionado para os testes subsequentes.

**Figura 9** - Padronização da curva tempo-resposta do efeito da 6-OHDA sobre a expressão do NF- $\kappa$ B em células neuronais (linhagem PC-12)



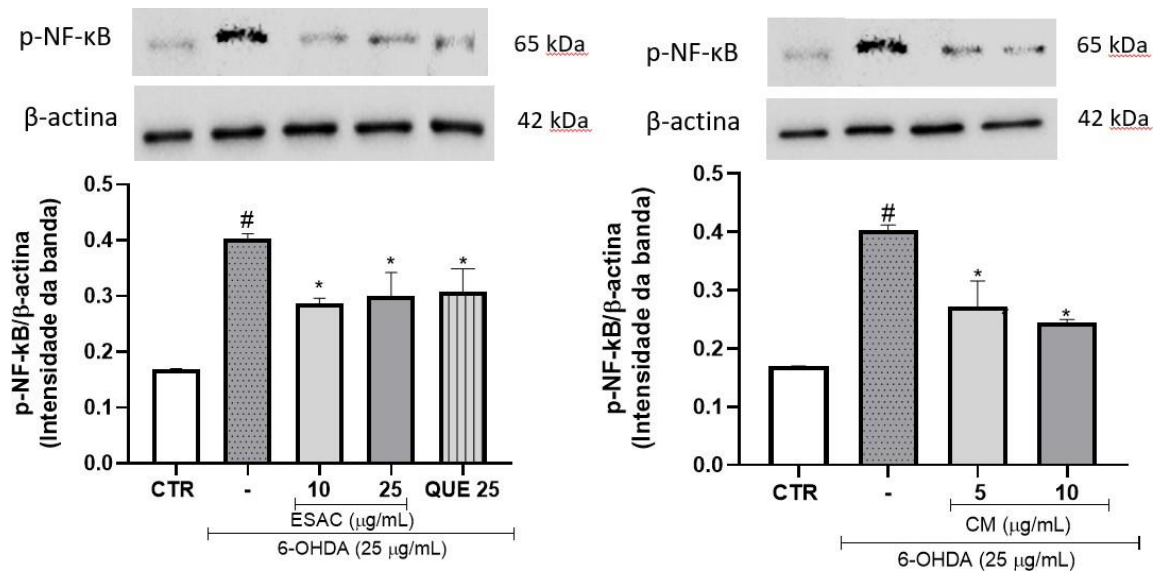
Fonte: o autor (2025). Legenda: Curva de tempo para a expressão de p-NF- $\kappa$ B em células PC-12 expostas a 6-OHDA. Os dados foram normalizados em relação à proteína  $\beta$ -actina e apresentados como intensidade de sinal. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. One-way ANOVA para o gráfico, seguido de pós-teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga).

#### 5.4 ESAC e CM reduziram a fosforilação da via de sinalização intracelular do NF- $\kappa$ B induzida pela 6-OHDA em células neuronais (linhagem PC-12)

O potencial do ESAC e CM em reduzir o processo de fosforilação dessa via (subunidade p65) pode ser observado na **Figura 10**. Os resultados de *Western blotting* mostraram que a 6-OHDA induziu um aumento significativo na fosforilação da subunidade p65 (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,5 \pm 0,01$ ), quando comparado ao grupo controle (não tratado) (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,02$ ), representando um aumento de aproximadamente 58%. O pré-tratamento das células PC-12 com ESAC (6-OHDA+ESAC: 10 e 25  $\mu$ g/mL) às células PC-12 inibiu de forma significativa a ativação dessa via (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,01$ ;  $0,3 \pm 0,04$ , respectivamente), quando comparada ao grupo 6-OHDA (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,4 \pm 0,01$ ), resultando em uma inibição da fosforilação de cerca de 29 e 25%. A redução da expressão do p-NF- $\kappa$ B causada pelo pré-tratamento das células PC-12 com ESAC (10 e 25  $\mu$ g/mL), foi comparável ao flavonol quercetina (25  $\mu$ M) (banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,01$ ;  $0,3 \pm 0,04$ ;  $0,3 \pm 0,04$ , respectivamente), anti-inflamatório de referência, e não diferiram estatisticamente.

De forma semelhante, a adição de CM (5, 10 e 25  $\mu$ g/mL) nas células PC-12 inibiu significativamente a ativação da via NF- $\kappa$ B (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,04$ ;  $0,2 \pm 0,01$ , respectivamente), quando comparado ao grupo 6-OHDA (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actina:  $0,4 \pm 0,01$ ), resultando em uma inibição da fosforilação de 32 e 39%, respectivamente.

**Figura 10** - Efeitos do ESAC e da CM sobre a via do NF- $\kappa$ B em células neuronais (linhagem PC-12) expostas à 6-OHDA



Fonte: O autor (2025). Legenda: Efeitos de ESAC e CM na expressão de p-NF- $\kappa$ B p65 em células PC-12 expostas a 6-OHDA. As células foram pré-tratadas com ESAC (10 e 25  $\mu$ g/mL), CM (5 e 10  $\mu$ g/mL) e QUE (25  $\mu$ M) por 15 minutos e expostas à 6-OHDA (25  $\mu$ g/mL) por mais 1 hora. Foi usado o Teste t de Student; CRT: DMSO 0,1% (veículo da droga). <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga), <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs grupo 6-OHDA.

## 6. DISCUSSÃO

O estudo permitiu demonstrar de maneira inédita o efeito neuroprotetor do extrato seco padronizado de *A. cearensis* (marcadores ativos: CM, AV e AMB) e de seu princípio ativo majoritário, a cumarina em modelo da doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em células neuronais - linhagem PC-12.

Essas células expressam características neurais e possuem altos níveis de enzimas (tirosina hidroxilase (TH), DOPA descarboxilase e dopamina- $\beta$ -hidroxilase) capazes de sintetizar e degradar catecolaminas dos neurotransmissores DA e NE. A expressão de TH é fundamental para catalisar a conversão do aminoácido tirosina em L-DOPA, um precursor direto da DA, justificando o uso da linhagem celular como modelo *in vitro* na DP (GREENE; REIN, 1977).

Células da linhagem PC-12 são amplamente utilizadas para testar potenciais agentes neuroprotetores. O modelo de 6-OHDA é um dos mais empregados para induzir a neurodegeneração presente na DP, que está muito associada à ativação de vias inflamatórias e apoptóticas, além da perda da função mitocondrial que contribui significativamente para instalação do estresse oxidativo (Assis *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2022; Gonzales *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2023). A 6-OHDA atravessa a membrana celular por meio do transportador DAT e, uma vez dentro da célula, desencadeia uma série de eventos que culminam na morte celular, associada ao efeito citotóxico (Alves, 2016). Nesse contexto, a neuroinflamação tem um papel crucial, exacerbando a progressão dos distúrbios neurodegenerativos e tornando-se um alvo importante para tratamentos neuroprotetores.

Os dados apresentados neste estudo demonstraram que o extrato seco padronizado de *Amburana cearensis* (ESAC) e seu ativo, cumarina (CM), apresentam atividade neuroprotetora em modelo *in vitro* de DP induzida por 6-OHDA em células neuronais PC-12. Considerando o potencial efeito observado do ESAC e de seu ativo CM, analisamos os mecanismos moleculares envolvidos, com ênfase na via de sinalização NF- $\kappa$ B, que está associada à neuroinflamação. Dessa forma, foi observado que o efeito neuroprotetor do ESAC e CM pode estar relacionado à inibição dessa via.

No presente estudo, tanto o ESAC (5-200  $\mu$ g/mL) quanto a CM (5-100  $\mu$ g/mL) não interferiram na viabilidade das células PC-12, o que foi confirmado pelo teste de MTT, e na presença da 6-OHDA, tanto o ESAC quanto a CM reduziram significativamente a

neurotoxicidade induzida pela neurotoxina. Esses resultados foram corroborados por estudos anteriores realizados pelo nosso laboratório em células microgliais (Araújo, 2023), neutrófilo humano (Amaral, 2017) e células mesencefálicas (Leal *et al.*, 2005) que avaliaram o extrato de *A. cearensis* e seus princípios ativos (CM e AMB).

A 6-OHDA é uma neurotoxina que causa dano celular por diversos mecanismos, incluindo o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, ativação de vias inflamatórias e apoptóticas. Quando dentro das células, transportada pelo DAT, a toxina não é metabolizada de forma eficiente, causando seu acúmulo no citoplasma celular e dando início a processos citotóxicos. A 6-OHDA sofre auto-oxidação e gera radicais livres como hidroxila radical ( $\text{OH}\cdot$ ) superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), danificando proteínas, lipídios de membrana e DNA. Quanto aos danos na respiração mitocondrial, esta neurotoxina bloqueia a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, especificamente no complexo I e IV, limitando a produção de ATP. Este processo ocasiona em um colapso do potencial de membrana mitocondrial, que libera citocromo c no citoplasma e ativa caspases, proteína que inicia a apoptose. Além dos processos citados, o dano neural causado pela 6-OHDA causa a ativação de astrócitos e microglias, consequentemente, liberando fatores pró-inflamatórios, como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$ , amplificando o estresse oxidativo e acelerando a neurodegeneração (Zhou *et al.*, 2022; Gonzales *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2023).

Como forma de analisar o efeito neuroprotetor do ESAC e da CM quando expostos à neurotoxina, foi realizado o teste de MTT, que mede a capacidade das células vivas de metabolizar o ensaio. O teste é capaz de avaliar a citotoxicidade de compostos e analisar efeitos de substâncias neuroprotetoras, detectando o metabolismo mitocondrial ativo, o número de células viáveis e o dano celular. O MTT quando adicionado nas células viáveis, é reduzido a formazan, indicando presença de metabolismo de enzimas mitocondriais. Dessa forma, os resultados sugerem que o ESAC e a CM podem estar reduzindo a neurotoxicidade da 6-OHDA auxiliando na manutenção da função mitocondrial, porém estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato de *A. cearensis* e seus princípios ativos (CM, AV e AMB) (Amaral, 2017; Leal *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2017). Além disso, outros trabalhos avaliaram o efeito do extrato a partir de sementes de *A. cearensis*, evidenciando seus efeitos neuroprotetores contra danos induzidos por glutamato (Pereira *et al.*, 2017). O fato do extrato e seu ativo CM reduzirem

o efeito neurotóxico sem interferir nos mecanismos celulares sugere que essas drogas podem atuar de forma seletiva em processos neuroprotetores, preservando o equilíbrio celular. Os dados obtidos corroboram os resultados de Araújo (2023), que evidenciou a atividade antioxidante (redução de NO, radical OH• e O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e anti-inflamatória (redução de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ). Outro estudo que corrobora esses achados é o de Amaral (2017), que demonstrou que o ESAC e seus ativos (CM, AV e AMB) apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória em culturas primárias de neutrófilos humanos.

Após evidenciarmos a faixa de concentração segura das drogas testes, bem como o efeito neuroprotetor avaliado através do teste do MTT, o estudo avançou para investigação da ação dessas drogas na via de ativação inflamatória do NF- $\kappa$ B, um importante mediador da resposta inflamatória. Para isso, foi realizada uma análise do tempo ideal de exposição das células PC-12 a 6-OHDA, sendo identificado que uma hora de exposição apresentou aumento da expressão dessa via de forma significativa (**Figura 9**).

Estudos pré-clínicos e a análise de cérebro de pacientes pós-morte têm comprovado o papel importante da neuroinflamação na instalação e agravamento de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. Dessa forma, selecionamos como marcador para avaliar o possível efeito neuroprotetor do ESAC e da CM o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que está relacionado com a regulação da resposta inflamatória e na expressão de genes que codificam enzimas oxidativas (como iNOS e COX-2), citocinas pró-inflamatórias e mediadores apoptóticos.

Após determinação do tempo para análise da expressão do NF- $\kappa$ B mediante a exposição das células PC-12 à 6-OHDA, foi avaliado efeito do ESAC e da CM. Tanto o ESAC quanto a CM reduziram a expressão do NF- $\kappa$ B. Quando ativada, essa via transloca o fator NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde estimula a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A inibição dessa via pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo efeito neuroprotetor observado, sugerindo que tanto o ESAC quanto a CM desempenham um papel importante na modulação da neuroinflamação associada à DP. Estudos realizados no nosso laboratório (Araújo *et al.*, 2022 e Araújo 2023) com células microgliais (BV-2) ativadas por LPS mostraram que o ESAC agiu pela via ERK1/2 na redução da inflamação, mas que não reduziu os níveis de fosforilação da via NF- $\kappa$ B, diferentemente dos resultados encontrados neste estudo.



Corroborando com a literatura, estudos anteriores realizados em nosso laboratório por Araújo (2023), mostrou que o ESAC não interferiu na via de sinalização do NF- $\kappa$ B, interferindo apenas na via de sinalização da MAPKs. Neste estudo, o extrato apresentou os seguintes teores de marcadores: CM =  $70,07 \pm 0,01$  mg/g; AV =  $2,02 \pm 0,01$  mg/g e AMB A =  $30,4 \pm 0,01$  mg/g. Portanto, se observarmos do ponto de vista químico de marcadores ativos, há uma diferença importante entre os dois extratos em relação ao atual (CM -  $35,16 \pm 0,01$  mg/g; AV  $2,02 \pm 0,01$  mg/g e AMB  $1,16 \pm 0,01$  mg/g). Essas diferenças podem estar relacionadas a sazonalidade.

Embora os resultados confirmem a eficácia da CM na modulação da via NF- $\kappa$ B, a interação entre os diversos ativos presentes no ESAC (AV, AMB e CM) ainda precisa ser mais investigada. Estudos futuros irão explorar essas interações e avaliar se o efeito neuroprotetor observado é exclusivamente mediado pela CM ou se outros ativos, em conjunto, contribuem para o efeito terapêutico observado.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o ESAC e a CM possuem atividade neuroprotetora e anti-inflamatória em células neuronais da linhagem PC-12, evidenciadas pelo aumento da viabilidade celular quando expostas à neurotoxina 6-OHDA e a redução da fosforilação na via NF- $\kappa$ B. Estudos adicionais, que abordarão outras vias de sinalização envolvidas na neuroproteção, são necessários para melhor descrição do mecanismo molecular de ação neuroprotetora do ESAC e da CM. Além disso, é fundamental investir no estudo desses materiais *in vivo*.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou o efeito neuroprotetor do ESAC e de seu ativo CM em células neuronais (linhagem PC-12), expostas à neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. Este trabalho representa um avanço significativo no desenvolvimento de potenciais fitoterápicos e/ou fitofármacos para o tratamento da DP, especialmente ao estabelecer a padronização da curva de expressão de p-NF- $\kappa$ B em células PC-12 submetidas à 6-OHDA. Os resultados indicam que o ESAC e a CM exercem efeito anti-inflamatório relevante, evidenciado pela redução da expressão da via NF- $\kappa$ B, o que sugere sua contribuição na modulação da neuroinflamação associada à neurodegeneração. Dessa forma, investigações adicionais são necessárias para elucidar de maneira mais detalhada os mecanismos moleculares pelos os quais o ESAC e o ativo CM promovem efeito neuroprotetor e anti-inflamatório, abrindo caminho para novas estratégias terapêuticas no tratamento da DP.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. *et al.* Amburana cearensis – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 16 nov. 2010.

ALMEIDA, K. *et al.* Effects of Amburoside A and Isokaempferide, Polyphenols from Amburana cearensis, on Rodent Inflammatory Processes and Myeloperoxidase Activity in Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 3, p. 198–205, 2009.

ALVES, A. A. **Efeito do ácido tânico sobre a toxicidade induzida pela 6-OHDA em células PC12, um modelo in vitro de doença de Parkinson**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

AMARAL, H. H. S. **Extrato seco padronizado de Amburana cearensis cultivada e constituintes químicos modulam a inflamação em um novo modelo de asma exacerbada em camundongos BALB/C e a resposta neutrofílica in vitro**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2017.

AMARAL, H. O. **Avaliação do efeito neuroprotetor da Occidentalina-1202 sobre o modelo de indução parkinsoniana em camundongos por 6-OHDA**. Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, 2021.

ARAÚJO, A *et al.* Antineuroinflammatory Effect of Amburana cearensis and Its Molecules Coumarin and Amburoside A by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway in LPS-Activated BV-2 Microglial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–14, 28 abr. 2022.

ARAÚJO, A. B. **Efeito anti-inflamatório do extrato seco padronizado e ativos (cumarina e amburosídeo A) de Amburana cearensis em modelos experimentais de neuroinflamação e doença de Parkinson: Papel da via TLR-4/NF- $\kappa$ B/MAPK**. 2023. 127 f. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.**

ASSIS, A. L. C. Extrato etanólico de byrsonima sericea protege células pc12 da toxicidade induzida pela 6-hidroxidopamina (6-ohda) em modelo in vitro de parkinsonismo experimental. 2018. 80 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.**

BENAZZOUZ, A. *et al.* Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. MAY, 2014.

BENITA WIATRAK *et al.* **PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions**. *Cells*, v. 9, n. 4, 14 abr. 2020.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. **Estresse oxidativo e doença de Parkinson: uma atualização sobre modelos baseados em tóxicos**. *Current Opinion in Neurology*, v. 28, n. 2, p. 193-200, 2015.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. **Parkinson's disease: animal models and dopaminérgico cell vulnerability.** *Frontiers in Neuroanatomy* , v. 8, p. 155, 2014.

CANUTO, K. M. et al. Amburanins A and B from Amburana cearensis : daphnodorin-type biflavonoids that modulate human neutrophil degranulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society** , São Paulo, v. 25, n. 4, p. 639-47, 2014.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (Amburana cearensis A. C. smith). **Química Nova**, v. 33, p. 662-666, 2010.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. **Doença de Parkinson: mecanismos e modelos.** *Neurônio* , v. 39, n. 6, pág. 889–909, 2003. doi:10.1016/S0896-6273(03)00568-3.

DE ARAÚJO, A.B.; AZUL, f.V.C.S.; SILVA, F. R. M.; ALMEIDA, T. S.; OLIVEIRA, J. V. N.; PIMENTA, A. T. A.; BEZERRA, A. M. E.; MACHADO, N. J.; LEAL, L. K. A. M. Antineuroinflammatory Effect of Amburana cearensis and Its Molecules Coumarin and Amburoside A by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway in LPS-Activated BV-2 Microglial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1-14, 2022.

DORSEY, E. R.; BLOEM, B. R. **The Parkinson Pandemic—A Call to Action.** *JAMA Neurology*, v. 75, n. 1, p. 9, 1 jan. 2018. Disponível em: . Acesso em: 3 jul. 2023.

ERKKINEN, M. G.; KIM, M.-O.; GESCHWIND, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a033118, 17 jul. 2018.

EXNER, N., Lutz, AK, Haass, C., & Winklhofer, KF (2012). Mitocôndrias na doença de Parkinson: vias moleculares e implicações patológicas. **EMBO Journal** , 31(14), 2749–2764.

FATHI, Mobina; VAKILI, Kimia; YAGHOOBPOOR, Shirin; QADIRIFARD, Mohammad Sadegh; KOSARI, Mohammadreza et al. Estudos pré-clínicos identificando vias moleculares de neuroinflamação na doença de Parkinson: uma revisão sistemática. **Frontiers in Aging Neuroscience** , v. 14, p. 855776, 2022.

FEARNLEY, IM et al. O gene  $\beta$ -actina: um controle interno para Northern e Western blotting. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 6, p. 1169-1173, 1991.

FU, L.; M. FU, K. A. Analysis of Parkinson's disease pathophysiology using an integrated genomics-bioinformatics approach. *Pathophysiology*, v. 22, p. 15-29, 2015.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNE, B.; MARCHETTO, M. C.; FRED H GAGE, F. H. **Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration.** NIH Public Access, v. 6, p. 918- 934, 2010.

GOMES, N. G. M. et al. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1372–1389, nov. 2009.

GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, P., Zampese, E., & Surmeier, DJ (2022). Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na doença de Parkinson: Insights do modelo 6-OHDA. **Tendências em Neurociências**, 45 (3), 201-217.

GREENE, L. A.; REIN, G. Release of (3H)norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. **Brain research**, v. 138, n. 3, p. 521–528, 23 dez. 1977.

HAYES, M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine*, v. 132, n. 7, p. 802–807, 1 jul. 2019.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, LM; VILLANUEVA-OLIVO, A. **O modelo 6-hidroxidopamina e a fisiopatologia parkinsoniana: novas descobertas em um modelo mais antigo.** *Neurologia (Edição em Inglês)*, v. 8, pág. 533-539, 2017.

Hirsch, CE e Hunot, S. (2009). *Neuroinflamação na doença de Parkinson: um alvo para neuroproteção?* **The Lancet Neurology**, 8 (4), 382-397.

HUANG, Y.-N. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. *Journal of neuroinflammation*, v. 12, n. 1, 12 ago. 2015.

JUNG, J. Y.; TWEEDIE, D.; SCERBA, M. T.; GREIG, N. H. Neuroinflamação como fator de doença neurodegenerativa: análogos da talidomida como tratamentos. **Frontiers in cell and Developmental Biology**, v. 7, P. 1-24, 2019.

KABUTO, H.; YAMANUSHI, T. Efeitos de Zingerone[4-(4-Hidroxi-3-Metoxifenil)-2-Butanona] e Eugenol [2-Metoxi-4-(2-Propenil)Fenol] no Progresso Patológico no Modelo de Camundongo com Doença de Parkinson Induzida por 6-Hidroxidopamina. *Journal of Oleo Science*, v. 60, n. 4, p. 395-402, 2011.

LAWRENCE, Tom. **A via do fator nuclear NF-κB na inflamação.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEAL, L. et al. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 388, n. 2, p. 86–90, nov. 2005.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, p.221-227, 1997.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151-159, 2000.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, R.A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 335-340, 2003.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, R. A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 335-340, 2003b.

LEAL, L. K. A. M.; PIERDONÁ, T. M.; GÓES, J.G.S.; FONSÊCA K.S.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; VIANA G. S. B. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis*, A.C. Smith, **Phytomedicine**, v. 18, p. 230-233, 2011.

LEAL, L.K.A.M., OLIVEIRA, F.G., FONTENELE, J.B., FERREIRA, M.A.D., VIANA, G.S.B. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003a.

LIMA, N. R. Desenvolvimento farmacêutico e avaliação farmacológica do extrato padronizado (CLAE-DAD) e constituintes químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada. **Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia**, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEVES, J. D.; ALMEIDA, L. P.; CAVADAS, C. Neuropeptide Y (NPY) as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 95, p. 210-224, 2016.

NEWMAN, DJ; CRAGG, GM **Produtos naturais como fontes de novos fármacos nos últimos 25 anos**. *Journal of Natural Products* , v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

OLAJIDE, A. O.; BHATIA, S. H.; OLIVEIRA, C. A.; WRIGHT, C. W.; FIEBICH, B. L. Inibição da neuroinflamação na microglia ativada por LPS por Cryptolepine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

OLIVEIRA, FS, & Lima, GA (2020). "Ativação microglial e neuroinflamação em doenças neurodegenerativas: Implicações para a doença de Parkinson". **Jornal de Pesquisa Neuroimune**, 58(2), 78-94

OLIVEIRA, R. et al. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 672–676, 2009.

PEREIRA, E. C.; LUCETTI, D. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRITO, E. M.; MONTEIRO, V. S.; MANOEL PATROCÍNIO, C. A.; MOURA, R. R.; LEAL, L. K. A. M.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 454, p. 139–142, 2009.

PEREIRA, E. P. L.; SOUZA, S. B.; SANTOS, C. C.; SANTOS, L.O.; CERQUEIRA, M.D; . FERNANDEZ, L. G.; SILVA, V. D. A. COSTA, S. L. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 199-205, 2017.

RODRIGUES, N. L. C. **Bioprospecção e seleção de ativos de *Amburana cearensis* com efeito leishmanicida (*Leishmania braziliensis*) por imunomodulação**. 2020. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

SANTOS et al. **Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of L. with demonstrated antioxidant properties in vitro.** v. 81, n. 3, p. 593–600, 1 jul. 2005.

SANTOS, G. F.; SILVA, G. de Q. N. e; MOREIRA, D. R.; VERGUTZ, B. G.; CARVALHO, J. P. de M.; PESSOA, J. P. A.; JUNIOR, V. P. do N.; TAFURI, N. F. Doença de Parkinson: Padrão epidemiológico de internações no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, 3 jan. 2022.

SILVA, AT, & Souza, MP (2021). *Diferenças na morfologia, proliferação e mecanismos de resposta das células BV-2 e PC-12.* **Jornal de Biologia Celular**, 39(4), 112-125.

SILVA, É. C. *et al.* Mecanismos de morte celular induzidos por 6-OHDA em neurônios dopaminérgicos. **Revista de Ciências Biológicas**, v. 3, pág. 45-53, 2018.

SILVA, J. H. C. FERREIRA, R. S.; PEREIRA, E. P.; BRAGA-DE-SOUZA, S.; ALMEIDA, M. M. A.; SANTOS, C. C.; BUTT, A. M.; CAIAZZO, E.; CAPASSO, R.; SILVA, V. D. A.; 111 COSTA, S. L. Amburana cearensis: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds. **Molecules**, v. 25, p. 1–16, 2020.

SMITH, JA, & Johnson, RL (2022). Inibição e excitação na ativação microglial e neuroinflamação . **Jornal de Pesquisa em Neurociências**, 45(3), 223-240.

SPRENGER, F.; POEWE, W. **Management of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease.** CNS drugs, v. 27, n. 4, p. 259–272, abr. 2013.

WAN, Ying *et al.* Inibição da função da proteína BET suprimiu a superativação da via de sinalização canônica NF-κB em modelo de rato lesionado por 6-OHDA de discinesia induzida por levodopa. **Frontiers in Neuroscience**, 2023.

WU, DC, Teismann, P., Tieu, K., & Vila, M. (2023). Vias de sinalização inflamatória no modelo 6-OHDA da doença de Parkinson: Papel da ativação microglial e do estresse oxidativo. **Journal of Neuroinflammation**, 20 (1), 129.

YACOUBIAN, T. A. Neurodegenerative Disorders. Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders, p. 1–16, 2017.

YANG, W. et al. **Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S.** npj Parkinson's Disease, v. 6, n. 1, 9 jul. 2020

ZHOU, C., Huang, Y., & Przedborski, S. (2022). **Modelo 6-OHDA da doença de Parkinson: Mecanismos de neurotoxicidade e alvos terapêuticos.** *Neurobiologia da Doença*, 173, 105892.