



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**FRANCISCO VINICIUS CLEMENTE SERRA AZUL**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO  
AMBUROSÍDEO A DE *Amburana cearensis* A.C SMITH EM CÉLULAS  
MICROGLIAIS: PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E MAPKs**

**FORTALEZA**

**2022**

FRANCISCO VINICIUS CLEMENTE SERRA AZUL

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO  
AMBUROSÍDEO A DE *Amburana cearensis* A.C SMITH EM CÉLULAS  
MICROGLIAIS: PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E MAPKs

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

- S496a Serra Azul, Francisco Vinicius Clemente.  
Atividade anti-inflamatória de análogos sintéticos do amburosídeo A de *Amburana cearensis* A.C Smith em células microgliais: papel das vias de sinalização do NF-kB e MAPKs / Francisco Vinicius Clemente Serra Azul. – 2022.  
84 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. microglia. 2. proteínas quinases ativadas por mitógeno. 3. NF-kappa B. 4. inflamação. 5. doenças neuroinflamatórias. I. Título.

CDD 615.1

---

FRANCISCO VINICIUS CLEMENTE SERRA AZUL

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO  
AMBUROSÍDEO A DE *Amburana cearensis* A.C SMITH EM CÉLULAS  
MICROGLIAIS: PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E MAPKs

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

Aprovada em: 24/08/2022

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Universidade de Brasília (UNB)

A Deus.

Aos meus pais, Vladson e Gicelma.

A todos aqueles que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por toda força dada e por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus pais, Vladson e Gicelma, por serem os melhores pais do mundo sempre carinhosos e atenciosos, por mais que eu fosse chato e estressado, sempre estiveram ao meu lado me dando apoio incondicional.

À Camila Gadelha, por ser muito mais que minha namorada, sendo também minha melhor amiga e grande companheira, sempre me motivando, ajudando a manter a calma e ser positivo.

Ao meu grande amigo João Antônio, o qual considero como um irmão, obrigado por todo o companheirismo e por estar comigo desde os primórdios da faculdade.

Obrigado a Bruna, Rebeca e Raysse, um trio de mulheres geniais, fortes e maravilhosas que me ajudou imensamente na realização deste trabalho.

À professora Kalyne, por sua ótima orientação, e ao CEFAC que há tanto tempo me acolheu, e é constituído por pessoas maravilhosas as quais não poderia deixar de agradecer (Cirineu, Jonatas, Kethyma, Glady, Emmanuel Oliveira, Ana Laura, Talita, Talyson, Nuno e Lyara) parte essencial dessa minha jornada acadêmica/científica.

Ao meu cunhado André Luís e meus sogros Luiz e Raimunda, obrigado por todos os conselhos, momentos de descontração e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

As grandes amizades que fiz na faculdade e que tenho certeza que carregarei por toda vida (Eduardo Santana, Mateus Moraes, Paulo George, Fred Marx, Roberto Sousa, Emanuel Magalhães, Brenna Silva, Thaynara Carvalho, Pedro Nonato, Thiago Miranda, Davi Dantas, Yuri Freitas), agradeço por todos os momentos de descontração.

Aos colaboradores da UNB pela síntese de moléculas tão promissoras, as quais tenho certeza que terão grande impacto e relevância em nossa sociedade.

Ao CNPq (bolsa sob número de processo 130464/2020-1), a UFC e o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pelo apoio financeiro, suporte técnico e estrutural.

A todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para a realização e conclusão desta etapa.

Gratidão!

## RESUMO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DO AMBUROSÍDEO A DE *Amburana cearensis* A.C SMITH EM CÉLULAS MICROGLIAIS: PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E MAPKs. Aluno: Francisco Vinicius Clemente Serra Azul. Orientadora: Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2022.

A micróglia possui funções imunes no sistema nervoso central, incluindo a síntese e liberação de inúmeros mediadores inflamatórios na resposta neuroimuneinflamatória, que possui um papel central no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas de alto impacto social, como doença de Parkinson e Alzheimer, as quais dispõem de farmacoterapias que tratam os sintomas e que por vezes trazem uma série de efeitos adversos que dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento. Dessa forma, considerando as limitações atuais da farmacoterapia dessas doenças neuroinflamatórias, a busca de novos fármacos é essencial. Estudos progressos desenvolvidos em nosso laboratório com animais (ratos e camundongos) e linhagens celulares (neutrófilos, BV2, células mesencefálicas) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetores e neuroprotetores do extrato padronizado e/ou amburosídeo (AMB) de *Amburana cearensis* (cumaru, Fabaceae). O AMB possui um baixo rendimento extrativo, dessa forma, é estratégico usar essa molécula como um protótipo para síntese laboratorial. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório de análogos sintéticos de AMB em modelo de neuroinflamação em células microgliais de linhagem BV2. Para tanto, foram investigados os efeitos dos análogos de AMB (A23, A30, A33 e A35) sobre a viabilidade de células BV2 (teste do MTT). Foi investigado também os efeitos dos análogos de AMB sobre a produção de marcadores inflamatórios (óxido nítrico, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos mesmos e na sinalização celular (iNOS, JNK, ERK, p38, NF- $\kappa$ B) induzida por lipopolissacarídeo (LPS, 0,5  $\mu$ g/ml) em células BV2. Dentre os análogos investigados (5-100  $\mu$ g/ml), foi observada uma redução da viabilidade celular em torno de 60% para os análogos A23 e o A35 (nas concentrações  $\geq$  25  $\mu$ g/ml), enquanto que para o A30 isso aconteceu nas concentrações  $\geq$  50  $\mu$ g/ml. As concentrações não tóxicas foram empregadas para prosseguir o estudo. Os análogos A23 e A35 (10  $\mu$ g/ml) reduziram a produção de NO em 42% e 77%, respectivamente, enquanto

o A30 (25 µg/ml) reduziu em 52 %. O análogo A33 não interferiu de maneira significativa na concentração de NO em células BV2 expostas ao LPS. O A23 e o A35 (análogos mais promissores), reduziram a produção das citocinas pró-inflamatórias, sendo as reduções máximas: IL-1 $\beta$  (A23 10 µg/ml: 54,6%; A35 5 µg/ml: 41,5%), IL-6 (A23 10 µg/ml: 58,7%; A35 10 µg/ml: 36,7%) e TNF- $\alpha$  (A23 10 µg/ml: 89,2%; A35 10 µg/ml: 85,3%). O estudo prosseguiu com o A35 (10 µg/ml), mais promissor, que foi capaz de reduzir a expressão de iNOS (33,1%), JNK (54,8%), ERK (17,2%), p38 (26,7%) e NF- $\kappa$ B (35,6%). Os análogos de AMB, A23, A30 e A35, possuem efeito anti-inflamatório em células microgliciais, ao reduzirem a produção de citocinas inflamatórias e/ou NO. Para o A35, esse efeito parece estar associado a redução biossíntese de NO, e inibições de vias de sinalização celular, como NF- $\kappa$ B e MAPKs (JNK, ERK1/2 e p38).

**Palavras-chave:** microglia, proteínas quinases ativadas por mitógeno, NF-kappa B, inflamação, doenças neuroinflamatórias



## ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SYNTHETIC ANALOGS OF AMBUROSIDE A FROM *Amburana cearensis* A.C SMITH IN MICROGLIAL CELLS: ROLE OF NF- $\kappa$ B AND MAPKs SIGNALING PATHWAYS. Author: Francisco Vinicius Clemente Serra Azul. Advisor: Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Master Degree. Program of Pos-Graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2022.

Microglia has immune functions in the central nervous system, including synthesis and release of numerous inflammatory mediators in the neuroimmune-inflammatory response, which has a central role in the development of neurodegenerative diseases of high social impact, such as Parkinson's and Alzheimer's disease, which have pharmacotherapies that treat symptoms and that sometimes bring a series of adverse effects that make it difficult for patients to adhere to treatment. Thus, considering the current limitations of the pharmacotherapy of these neuroinflammatory diseases, the search for new drugs is essential. Previous studies carried out in our laboratory with animals (rats and mice) and cell lines (neutrophils, BV2, mesencephalic cells) demonstrated the anti-inflammatory, hepatoprotective and neuroprotective effects of the standardized extract and/or amburoside (AMB) of *Amburana cearensis* (cumaru, Fabaceae). AMB has a low extractive yield, thus, it is strategic to use this molecule as a prototype for laboratory synthesis. The objective of this work was to investigate the anti-inflammatory effect of synthetic analogues of AMB in a model of neuroinflammation in microglial cells of the BV2 lineage. Therefore, the effects of AMB analogues (A23, A30, A33 and A35) on the viability of BV2 cells (MTT test) were investigated. We also investigated the effects of AMB analogues on the production of inflammatory markers (nitric oxide, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and the expression of proteins involved in their biosynthesis and cell signaling (iNOS, JNK, ERK, p38, NF- $\kappa$ B) induced by lipopolysaccharide (LPS, 0.5  $\mu$ g/ml) in BV2 cells. Among the investigated analogues (5-100  $\mu$ g/ml), a reduction in cell viability of around 60% was observed for analogues A23 and A35 (at concentrations  $\geq$  25  $\mu$ g/ml), while for A30 this happened at concentrations  $\geq$  50  $\mu$ g/ml. Non-toxic concentrations were used to proceed with the study. Analogs A23 and A35 (10  $\mu$ g/ml) reduced NO production by 42% and 77%, respectively, while A30 (25  $\mu$ g/ml) reduced it by 52%. The A33 analogue did not significantly interfere with the

concentration of NO in BV2 cells exposed to LPS. A23 and A35 (most promising analogues) reduced the production of pro-inflammatory cytokines, with the maximum reductions being: IL-1 $\beta$  (A23 10  $\mu$ g/ml: 54.6%; A35 5  $\mu$ g/ml: 41.5%), IL-6 (A23 10  $\mu$ g/ml: 58.7%; A35 10  $\mu$ g/ml: 36.7%) and TNF- $\alpha$  (A23 10  $\mu$ g/ml: 89.2%; A35 10  $\mu$ g/ml: 85.3%). The study proceeded with the most promising A35 (10  $\mu$ g/ml), which was able to reduce the expression of iNOS (33.1%), JNK (54.8%), ERK (17.2%), p38 (26.7%) and NF- $\kappa$ B (35.6%). The AMB analogs, A23, A30 and A35, have an anti-inflammatory effect on microglial cells, by reducing the production of inflammatory cytokines and/or NO. For A35, this effect seems to be associated with reduced NO biosynthesis, and inhibition of cell signaling pathways, such as NF- $\kappa$ B and MAPKs (JNK, ERK1/2 and p38).

**Keywords:** microglia, mitogen-activated protein kinases, NF-kappa B, inflammation, neuroinflammatory diseases

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Principais tipos celulares da neuroglia .....	p. 21
<b>Figura 2</b> – Polarização da micróglia nos fenótipos M1/M2 .....	p. 26
<b>Figura 3</b> – Liberação de mediadores pró-inflamatórios pela micróglia através da ativação do receptor TLR-4 estimulado por LPS .....	p. 27
<b>Figura 4</b> – <i>Amburana cearensis</i> A.C. Smith cultivada .....	p. 31
<b>Figura 5</b> - Estrutura química do amburosídeo A .....	p. 33
<b>Figura 6</b> – Delineamento experimental .....	p. 37
<b>Figura 7</b> – Características químicas dos análogos sintéticos de amburosídeo A .....	p. 37
<b>Figura 8</b> - Síntese do amburosídeo A e de seus análogos .....	p. 39
<b>Figura 9</b> - Estruturas químicas dos análogos sintéticos de amburosídeo A .....	p. 43-44
<b>Figura 10</b> – Avaliação da citotoxicidade dos análogos de amburosídeo A em linhagem microglial BV2 .....	p. 46-47
<b>Figura 11</b> – Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a produção de NO em células microgliais de linhagem BV2 .....	p. 49
<b>Figura 12</b> – Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a liberação de IL-1 $\beta$ em células microgliais de linhagem BV2 .....	p. 50
<b>Figura 13</b> – Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a produção de IL-6 induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p. 51
<b>Figura 14</b> – Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a produção de TNF- $\alpha$ induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p. 52
<b>Figura 15</b> – Efeito do análogo A35 sobre a expressão da proteína óxido nítrico sintase induzida (iNOS) induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p. 53

<b>Figura 16</b> – Efeito do análogo A35 sobre a expressão do fator nuclear kappa b (NF-κB) induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p.54
<b>Figura 17</b> – Efeito do análogo A35 sobre a expressão da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p.55
<b>Figura 18</b> – Efeito do análogo A35 sobre a expressão da quinase N-terminal c-Jun (JNK) induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p.56
<b>Figura 19</b> – Efeito do análogo A35 sobre a expressão da proteína p38 induzida por LPS em células microgliais de linhagem BV2 .....	p.57
<b>Figura 20</b> – Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios pela micróglia através da ativação do receptor TLR-4 estimulado por LPS .....	p. 68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB –	Amburosídeo A
APP –	Proteína precursora amilóide
BCRJ –	Banco de células do Rio de Janeiro
BHE –	Barreira hematoencefálica
BSA –	Albumina de soro bovino
CCL4 –	Tetracloroeto de carbono
CL's –	Corpos de Lewy
COX –	Ciclooxigenase
CSF1R –	Receptor do fator 1 estimulador de colônias
CX3CR1 –	Receptor 1 de quimiocina CX3C
DA –	Doença de Alzheimer
DAMPs –	Padrões moleculares associados a dano
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DN –	Doença neurodegenerativa
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Doença de Parkinson
ELA –	Esclerose lateral amiotrófica
eNOS –	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM –	Erro padrão da média
ERK –	Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs –	Espécies reativas de nitrogênio
EROs –	Espécies reativas de oxigênio
FBS –	Soro fetal bovino
GFAP –	Proteína glial fibrilar ácida
HEXB –	Beta-hexosaminidase
IFN –	Interferon
IL –	Interleucina
iNOS –	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK –	Interleucina-1 associada a kinase
LCR –	Líquido cefalorraquidiano
LPS –	Lipopolissacarídeo
M1 –	Micróglia classicamente ativada
M2 –	Micróglia alternativamente ativada
MAPK –	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MTT –	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
NEED –	N-(1-naftil) -etilenoidiamina
NF-κB –	Fator nuclear κB
nNOS –	Óxido nítrico sintase neuronal
NO –	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> –	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> –	Ânion superóxido

ONOO-	–	Peroxinitrito
P2RY12	–	Receptor purinérgico P2Y12
p38	–	Proteína quinase ativada por mitógeno
PAMPs	–	Padrões moleculares associados a patógenos
PVDF	–	Fluoreto de Polivinilideno
RPMI	–	Roswell Park Memorial Institute
SALL1	–	Sal-like 1
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SNC	–	Sistema nervoso central
SNP	–	Sistema nervoso periférico
TBS-T	–	Tris-Tween 20
TGF- $\beta$	–	Fator de crescimento transformador $\beta$

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
RCF	Força Centrífuga Relativa
%	Porcentagem
g	Grama (s)
°C	Grau(s) centígrado(s)
K	Kappa
kg	Quilograma (s)
$\mu$ g	Microgramas(s)
$\mu$ l	Microlitro (s)
mg	Miligrama (s)
ml	Mililitro (s)
M	Molar
nm	Nanômetro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas	18
1.2. Micróglia: do papel fisiológico à alvo farmacológico	21
1.3. Modelos de neuroinflamação e estresse oxidativo <i>in vitro</i>	28
1.4. <i>Amburana cearensis</i> A.C Smith	30
1.5. Amburosídeo A: protótipo de fármaco anti-neuroinflamatório	32
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Geral	36
3.2. Específicos	36
4. METODOLOGIA .....	37
4.1. Delineamento experimental	37
4.2. Materiais de estudo	37
4.3. Substâncias químicas e anticorpos	38
4.4. Síntese dos análogos de amburosídeo A	38
4.5. Cultivo celular de linhagem BV2	39
4.6. Avaliação da citotoxicidade	40
4.7. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	40
4.8. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	41
4.9. Western blot	41



4.10. Análise estatística	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Análogos de amburosídeo A obtidos por síntese química	43
5.2. Avaliação da viabilidade celular pela redução do sal MTT a formazan em células microgliais	45
5.3. Efeito dos análogos de amburosídeo A sobre a produção de nitrito induzido por LPS em células microgliais de linhagem BV2	47
5.4. Moléculas A23 e A35 interferem na liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) em células microgliais estimuladas por LPS	49
5.5. Determinação da expressão da proteína óxido nítrico sintase induzido (iNOS) em células microgliais tratadas com os análogos A35 e estimuladas por LPS	53
5.6. Análogo A35 reduz a expressão da proteína NF- $\kappa$ B em células BV2 estimuladas por LPS	54
5.7. Efeito do análogo A35 sobre a expressão de proteínas do complexo das MAPK (ERK, JNK e p38) em células microgliais estimuladas por LPS em linhagem microglial	55
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS	70