



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANA BRUNA DE ARAÚJO**

**EFEITO ATI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO E ATIVOS  
(CUMARINA E AMBUROSÍDIO A) DE *Amburana cearensis* EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE NEUROINFLAMAÇÃO E DOENÇA DE PARKINSON:  
PAPEL DA VIA TLR-4/NF- $\kappa$ B/MAPK**

**FORTALEZA-CE**

**2023**

ANA BRUNA DE ARAÚJO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO E ATIVOS  
(CUMARINA E AMBUROSÍDIO A) DE *Amburana cearensis* EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE NEUROINFLAMAÇÃO E DOENÇA DE PARKINSON: PAPEL DA  
VIA TLR-4/NF- $\kappa$ B/MAPK

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

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

Coorientador: Prof. Dr. Nuno Miguel de Jesus  
Machado.

FORTALEZA-CE

2023

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)

---

- A687e Araújo, Ana Bruna de.  
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 / Ana Bruna de Araújo. – 2023.  
127 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.  
Coorientação: Prof. Dr. Nuno Miguel de Jesus Machado.
1. *Amburana cearensis*. 2. metabólitos secundários. 3. micróglia. 4. neuroinflamação. 5. doença de Parkinson. I. Título.

ANA BRUNA DE ARAÚJO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO E ATIVOS  
(CUMARINA E AMBUROSÍDIO A) DE *Amburana cearensis* EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE NEUROINFLAMAÇÃO E DOENÇA DE PARKINSON: PAPEL DA  
VIA TLR-4/NF- $\kappa$ B/MAPK

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC) *campus*-Sobral

---

Prof. Dr. Francisco José Oliveira Rios  
Research Institute of the McGill University Health Centre (RI-MUHC)

---

Dra. Talita Magalhães Rocha  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

## AGRADECIMENTOS

À Deus minha fortaleza, por ser meu guia ao longo da minha caminhada, permitindo que eu faça as melhores escolhas sempre.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À minha orientadora Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, profissional admirável, agradeço por me ter aceitado para orientação desde o primeiro contato que realizei, contribuindo sempre para o meu crescimento como pesquisadora, pelo carinho, ensinamentos e dedicação durante toda minha caminhada no doutorado.

Ao meu coorientador Nuno Miguel de Jesus Machado que através dos seus ensinamentos permitiu que esse trabalho esteja sendo concluído hoje, agradeço pela paciência, dedicação e pela valiosa ajuda nos experimentos.

Aos meus pais Gonçalo José de Araújo e Ana Betânia Vasconcelos de Araújo pelo incentivo em meus estudos, carinho, amor e dedicação, especialmente minha mãe, pois sem ela não estaria aqui nesse momento.

Aos meus irmãos Gonçalo de Araújo e Beatriz de Araújo e aos meus sobrinhos Neurimar Filho e Adrimar pelo carinho, amor e dedicação.

Ao meu namorado Cláudio Victor Macêdo Antunes com quem eu sei que passarei o resto da minha vida, agradeço pelo apoio, amor, carinho, companheirismo e paciência.

Aos meus sogros Dona Elaine Antunes e seu Cláudio Antunes pelo apoio, incentivo e dedicação que permitiu eu estar aqui hoje.

Ao Francisco Vinícius Clemente, Albert Layo Costa e Francisca Raysse Silva pela ajuda constante na realização dos experimentos e pela amizade.

Ao Talysson Silva e Cirineu Neto pela ajuda na produção e caracterização do extrato e pela amizade.

À Khetyma Moreira, Isabelle Albuquerque e Jonathas Almeida pela valiosa ajuda nos experimentos, amizade e dedicação.

Aos demais membros do CEFAC, em especial Juliana Pereira, João Antônio, Carla Damiana, Rebeca Colares e Kevylane Souza pela ajuda na realização dos experimentos e pela amizade.

À Universidade Federal do Ceará, pela disposição da infraestrutura para realização dos experimentos.

Aos funcionários da UFC, departamento de farmácia, em especial Elita, Lyara, Ana Paula, Daniele, William e Juliana por sempre estarem dispostos a ajudarem.

## RESUMO

Estudos têm demonstrado o papel da neuroinflamação na doença de Parkinson (DP) e de outras doenças neurodegenerativas, que apresentam importante atuação das células microgлияis dentre os mecanismos celulares envolvidos. Diante das limitações da farmacoterapia atual da DP, a pesquisa de novos fármacos é essencial. O extrato e/ou moléculas de *Amburana cearensis* têm demonstrado diversas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora, conforme determinado anteriormente por estudos do nosso laboratório. Diante do exposto, o estudo objetivou investigar os efeitos anti-inflamatório e antioxidante do extrato seco de *A. cearensis* cultivada (ESAC) e constituintes químicos (cumarina - CM, amburosídeo A - AMB e ácido vanílico - AV) em modelos de neuroinflamação em células microgлияis (linhagem BV-2), células neuronais (linhagem PC-12) e modelo de DP *in vivo*. Para tanto, foi investigado o efeito do ESAC e ativos (CM, AMB e AV) sobre a ativação de células microgлияis induzida por LPS, mensurado pela determinação da concentração de mediadores pró-inflamatórios e/ou oxidantes, como nitrito (Griees), citocinas pró-inflamatórias (ELISA) e expressão da proteína iNOS. Também foi realizada avaliação do papel de fatores de transcrição de genes pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ B p65 e MAPK), pertencentes às duas principais vias de sinalização inflamatória (I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B p65 e MAPKs), pela técnica de *Western blotting*. A atividade de eliminação de radicais livres das drogas testes também foi investigada. Para avaliar se a ação anti-inflamatória do extrato confere neuroproteção, foi investigado seu efeito em cultura de células neuronais (PC-12), assim como seu efeito em modelo de DP em ratos induzido por injeção unilateral de 6-OHDA (12  $\mu$ g/animal) no corpo estriado direito. Todas as drogas testes (100  $\mu$ g/mL) mostraram atividade sequestradora de radicais livres (HO $^{\cdot}$  e O $_2^{\cdot-}$ ). A adição de ESAC (1-100  $\mu$ g/mL), CM (1-100  $\mu$ g/mL), AMB (1-100  $\mu$ g/mL), ou AV (1-100  $\mu$ g/mL) às células BV-2 em cultura não alterou a viabilidade celular (teste MTT) e reduziu significativamente o aumento da produção de óxido nítrico (NO) induzido por LPS (0,5  $\mu$ g/mL) em células BV-2, mostrando a seguinte relação AMB>ESAC>CM>AV. Os resultados mostraram que apenas ESAC e AMB reduziram significativamente a expressão da proteína iNOS (*Western blotting*). ESAC, AMB e CM reduziram as concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), mas não afetaram significativamente os níveis de IL-10. Observou-se ainda que o AMB apresentou efeito imunomodulador, evidenciado pelo aumento na concentração de ureia. A redução dos mediadores inflamatórios exercida pelo ESAC deu-se pela diminuição da fosforilação da via das MAPKs (JNK e ERK1/2). Além disso, o ESAC (100  $\mu$ g/mL), presente no meio condicionado, preveniu a perda da viabilidade e

diminuiu a liberação de NO de células neuronais PC-12 expostas à 6-OHDA (10 µg/mL) e ao meio condicionado (oriundo de células BV-2 estimuladas com LPS). No estudo *in vivo*, demonstrou-se que a dose de 200 mg/Kg do ESAC reverteu os déficits motores induzidos pela 6-OHDA, além de elevar os níveis da superóxido dismutase (SOD) e reduzir os níveis de nitrito e a peroxidação lipídica. O estudo determinou de forma inédita o efeito anti-inflamatório e antioxidante do ESAC e ativos (CM e AMB) que parece estar associado à supressão da via das MAPKs, além de efeito neuroprotetor do ESAC no déficit motor induzido por 6-OHDA.

**Palavras-chave:** *Amburana cearensis*; metabólitos secundários; micróglia; neuroinflamação; doença de Parkinson.



## ABSTRACT

Studies have demonstrated the role of neuroinflammation in Parkinson's disease (PD) and other neurodegenerative diseases, which have an important role of microglial cells among the cellular tissues involved. Given the restrictions of current pharmacotherapy for PD, the search for new drugs is essential. *Amburana cearensis* extract and/or flag have demonstrated several pharmacological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective, as previously determined by studies in our laboratory. Given the above, the study aimed to investigate the anti-inflammatory and antioxidant effects of the dry extract of cultivated *A. cearensis* (ESAC) and chemical constituents (coumarin - CM, amburoside A - AMB and vanillic acid - VA) in models of neuroinflammation in cells microglia (BV-2 lineage), neuronal cells (PC-12 lineage) and in *in vivo* PD model. Therefore, the effect of ESAC and actives (CM, AMB and AV) on the activation of microglial cells induced by LPS was investigated, measured by the experience of the concentration of pro-inflammatory mediators and/or oxidants, such as nitrite (Griees), cytokines (ELISA) and iNOS protein expression. We also evaluated the role of pro-inflammatory gene transcription factors (NF- $\kappa$ B p65 and MAPK), belonging to the two main inflammatory signaling pathways (I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B p65 and MAPKs), using the Western blotting technique. The free radical scavenging activity of the tested drugs was also investigated. To assess whether the extract's anti-inflammatory action confers neuroprotection, its effect on neuronal cell culture (PC-12) was investigated, as well as its effect on a PD model in rats induced by unilateral injection of 6-OHDA (12  $\mu$ g/animal) in the right striatum. All tested drugs (100  $\mu$ g/mL) experienced free radical (HO $^{\cdot}$  and O $2^{\cdot-}$ ) scavenging activity. Addition of ESAC (1-100  $\mu$ g/mL), CM (1-100  $\mu$ g/mL), AMB (1-100  $\mu$ g/mL), or AV (1-100  $\mu$ g/mL) to BV-2 cells in culture did not alter cell viability (MTT test) and significantly increased nitric oxide (NO) production induced by LPS (0.5  $\mu$ g/mL) in BV-2 cells, showing the following relationship AMB>ESAC>CM>AV. The results appreciated that only ESAC and AMB significantly reduced iNOS (Western blotting) protein expression. ESAC, AMB and CM reduced tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6) concentrations but did not significantly affect IL-10 levels. It should also be noted that AMB had an immunomodulatory effect, as evidenced by the increase in urea concentration. The reduction in inflammatory mediators emitted by ESAC was due to the decrease in phosphorylation of the MAPK pathway (JNK and ERK1/2). Furthermore, ESAC (100  $\mu$ g/mL), present in the conditioned medium, prevented the loss of viability, and produced NO release from PC-12 neuronal cells exposed to 6-OHDA (10  $\mu$ g/mL) and to the environment (originating from LPS-stimulated BV-2 cells). In the *in vivo*

study, it was shown that a dose of 200 mg/Kg of ESAC reversed the motor deficits induced by 6-OHDA, in addition to raising superoxide dismutase (SOD) levels and reducing nitrite levels and lipid peroxidation. The study determined in an unprecedented way the anti-inflammatory and antioxidant effect of ESAC and actives (CM and AMB) that seem to be associated with the inhibition of the MAPKs pathway, in addition to the neuroprotective effect of ESAC on the motor deficit induced by 6-OHDA.

Keywords: *Amburana cearensis*; secondary metabolites; microglia; neuroinflammation; Parkinson's disease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de processo inflamatório e consequente morte neuronal mediada pelas células microgлияis na presença da $\alpha$ -sinucleína em condições patológicas de DP .....	25
Figura 2 – Esquema das vias ativadas após exposição ao LPS a cultura de células microgлияis. ....	31
Figura 3 – Mecanismo de ação do modelo de DP induzido por 6-OHDA. ....	33
Figura 4 – Esquema mostrando a <i>A. cearensis</i> aos 7 meses de cultivo e caracterização do extrato seco padronizado produzido a partir das folhas, caule e xilapódio, cujo ativos são CM, AV e AMB.....	38
Figura 5 – Fluxograma apresentando o detalhamento do delineamento experimental .....	41
Figura 6 – Desenho experimental indicando a linha do tempo dos procedimentos experimentais: Cirurgia e testes comportamentais.....	50
Figura 7 – Esquema do teste do campo aberto .....	51
Figura 8 – Esquema do teste do <i>rotarod</i> .....	51
Figura 9 – Esquema do teste rotacional induzido por apomorfina .....	52
Figura 10 – Perfis cromatográficos dos padrões ácido vanílico (1), amburosídio A (2) e cumarina (3).....	56
Figura 11 – Ensaio de atividade sequestrante exercida por ESAC, CM, AV e AMB (100 $\mu$ g/mL) .....	57
Figura 12 – Efeito de ESAC e constituintes químicos (CM, AMB e AV) na viabilidade celular de BV-2 determinado através do teste MTT. ....	59
Figura 13 – Efeito de ESAC, CM, AMB e AV na produção de nitrito induzida por LPS em células linhagem BV-2. ....	61
Figura 14 – Efeitos do ESAC, CM, AMB na expressão de iNOS em células BV-2 estimuladas	

por LPS .....	63
Figura 15 – Efeitos do ESAC, CM e AMB na atividade da arginase em células BV-2 estimuladas por LPS .....	65
Figura 16 – Efeito do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de TNF- $\alpha$ em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS. ....	67
Figura 17 – Efeitos do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de IL-6 em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS.....	68
Figura 18 – Efeito do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de IL-10 em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS .....	69
Figura 19 – Efeitos do ESAC nas vias TLR-4/NF- $\kappa$ B/ERK1/2 e JNK induzidas por LPS	70
Figura 20 – Mecanismo de ação do ESAC sobre as vias de sinalização (NF- $\kappa$ B e MAPKs) e produção de mediadores inflamatórios induzidas pela ativação com LPS em células microgliais da linhagem BV-2.....	72
Figura 21 – Efeitos do ESAC na neurotoxicidade de células da linhagem PC-12 expostas à 6-OHDA e induzidas por meio condicionado a partir de células linhagem BV-2 ativadas por LPS .....	74
Figura 22 – Efeito do ESAC no número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina.	76
Figura 23 – Efeito do ESAC na atividade locomotora no Teste de Campo Aberto ( <i>Open field test</i> ) de animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA. ....	78
Figura 24 – Efeito do ESAC na atividade motora (Teste de Rotarod) de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....	80
Figura 25 – Efeito do ESAC na produção de nitrito nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA. ....	82

Figura 26 – Efeito do ESAC nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.....	84
Figura 27 – Efeito do ESAC na atividade da superóxido dismutase nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da proteína NOS de acordo com a expressão em diferentes tipos celulares e função desempenhada .....	27
Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados para Western blot .....	47
Tabela 3 – Anticorpos secundários utilizados para Western blot.....	47
Tabela 4 – Grupos de tratamento .....	50
Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de ratos machos da linhagem <i>Wistar</i> utilizados no modelo de doença de Parkinson. ....	88
Tabela 6 – Dados dos eletrólitos quantificados em ratos machos da linhagem <i>Wistar</i> utilizados no modelo de doença de Parkinson. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Amburosídeo A
AP	Antero-posterior
AP-1	Proteína ativadora 1
AV	Ácido vanílico
7-AAD	7-aminoactinomycin D
BSA	Soro albumina bovino
CM	Cumarina
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DMSO	Dimetilsulfóxido
DV	Dorso ventral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESAC	Extrato Seco de <i>Amburana cearensis</i> cultivada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EPM	Erro padrão da média
eNOS	Sintase induzível endotelial
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
FBS	Soro fetal bovino
FO	Falso operado
EM	Esclerose múltipla
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto de ferro III
GSH	Glutathiona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPX	Hipoxantina
HPLC-PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência

IFN- $\gamma$	Interferon-gama
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
IL	Interleucina
IKK	Compleco quinase IKK
JNK	Proteína quinase c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal
Kg	Kilogramas
LPS	Lipopolissacarídeo
L-DOPA	Levodopa
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitogênio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MYD88	Gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88
ML	Médio lateral
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NEED	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride
NBT	Nitrotetrazolium blue chloride
NaOH	Hidróxido de sódio
6-OHDA	6-hidroxidopamina
OMS	Organização Mundial da Saude
PBS	Solução salina tamponada
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Polyvilydine difloride
RIPA	Radioimunoprecipitação
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Rotações por minuto
SPF	Livres de patógenos específicos
SNpc	Substância negra (parte compacta)
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$



TLR-4	Receptor Toll -like 4
TCA	Ácido tricloracético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Tris-Tween 20
TH	Tirosina hidroxilase
XOD	Xantina oxidase

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Percentagem
$\beta$	beta
$\alpha$	alfa
$\kappa$	kappa
$\gamma$	gama
$\mu\text{g}$	Micrograma (s)
mg	Miligramma (s)
g	Gramma (s)
kg	Quilogramma (s)
$\mu\text{L}$	Microlitro (s)
mL	Mililitro (s)
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 Inflamação e as doenças neurodegenerativas</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2 Epidemiologia e aspectos econômicos da doença de Parkinson</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3 Fisiopatologia da doença de Parkinson</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4 Neuroinflamação e o estresse oxidativo na doença de Parkinson</b> .....	<b>26</b>
<b>1.5 Modelos experimentais <i>in vitro</i> de neuroinflamação</b> .....	<b>28</b>
<b>1.6 Modelo animal de doença de Parkinson</b> .....	<b>31</b>
<b>1.7 Fitoterápicos e fitofármacos</b> .....	<b>33</b>
<b>1.8 <i>Amburana cearensis</i> e seus ativos como fonte em potencial de fármacos anti-inflamatórios/neuroprotetores</b> .....	<b>35</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>40</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Delineamento experimental</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2 Preparação e caracterização química de extrato seco de <i>A. cearensis</i> (ESAC)</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3 Análise por HPLC do ESAC</b> .....	<b>42</b>
<b>4.4 Substâncias químicas</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5 Determinação do sequestro do radical hidroxila (DOR)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6 Determinação do sequestro do ânion superóxido (NBT)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.7 Condições de cultivo celular linhagens BV-2 e PC-12</b> .....	<b>44</b>
<b>4.8 Ensaio de Viabilidade Celular</b> .....	<b>44</b>
<b>4.9 Mensuramento de NO</b> .....	<b>44</b>
<b>4.10 Determinação da atividade da arginase</b> .....	<b>45</b>
<b>4.11 Ensaio de imunoabsorção enzimática</b> .....	<b>45</b>
<b>4.12 Extração de proteínas e análise de Western blotting</b> .....	<b>45</b>
<b>4.13 Meio condicionado de células BV-2 expostas ao LPS em células PC-12 com a presença de 6-OHDA</b> .....	<b>47</b>
<b>4.14 Modelo <i>in vivo</i></b> .....	<b>48</b>

4.14.1 Animais .....	48
4.14.2 Drogas .....	48
4.15 Injeção unilateral com 6-OHDA .....	49
4.16 Testes comportamentais .....	50
4.16 Determinação da concentração de nitrito .....	53
4.17 Determinação da peroxidação lipídica .....	53
4.18 Determinação da atividade da superóxido dismutase .....	54
4.19 Avaliação Bioquímica do sangue .....	54
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
6.1 ESAC padronizado e constituintes químicos (CM, AV e AMB) .....	56
6.2 ESAC, AMB, CM e AV possuem atividade sequestradora de radicais livres: radical hidroxila e ânion superóxido .....	57
6.3 ESAC padronizado e constituintes químicos não são tóxicos para células microgliais BV-2. ....	58
6.4 ESAC e ativos (CM e AMB) reduzem a produção de NO em células microgliais estimuladas por LPS.....	60
6.5 ESAC e AMB reduzem a expressão de iNOS induzida por LPS em células BV-2 por Western Blotting .....	62
6.6 AMB impede a redução da atividade da arginase induzida por LPS em células da linhagem BV-2.....	64
6.7 ESAC, AMB e CM regulam a produção de citocinas em células microgliais estimuladas por LPS.....	66
6.8 ESAC diminui a fosforilação da via das MAPKs (ERK1/2 e JNK) induzidas por LPS em células da linhagem BV-2 .....	68
6.9 ESAC apresenta efeito antineuroinflamatório em células da linhagem PC-12 expostas à 6-OHDA e ao meio condicionado de células da linhagem BV-2 estimuladas por LPS..	73

<b>6.10 ESAC diminui rotações contralaterais em teste comportamental rotacional induzido por apomorfina de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA. ....</b>	<b>75</b>
<b>6.11 ESAC diminui déficit comportamental de ratos em modelo de DP induzido por 6-OHDA sobre a atividade locomotora (Teste do Campo Aberto) .....</b>	<b>77</b>
<b>6.12 ESAC melhora atividade motora (Teste de <i>Rotarod</i>) de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.....</b>	<b>79</b>
<b>6.13 ESAC diminui a produção de nitrito nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....</b>	<b>81</b>
<b>6.14 ESAC reduz a peroxidação lipídica (método TBARS) em áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....</b>	<b>83</b>
<b>6.15 ESAC aumenta a atividade da superóxido dismutase nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....</b>	<b>85</b>
<b>6.16 Avaliação bioquímica do sangue de ratos tratados com ESAC e submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA .....</b>	<b>87</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1. 1 Inflamação e as doenças neurodegenerativas**

O sistema imune inato serve como uma primeira linha de defesa do hospedeiro através da sua capacidade de responder a patógenos e sinais de perigo. Desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase do tecido e da resposta à infecção e lesão. Diferentes tipos celulares estão incluídos na resposta inflamatória, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras. Durante a infecção, a quimiotaxia é um importante evento para o recrutamento de células para o sítio de inflamação. Visto isso, as respostas de defesa, incluindo inflamação, são geralmente benéficas ao organismo, agindo para restringir a sobrevivência e proliferação dos patógenos invasores, promover a sobrevivência do tecido, reparo, recuperação e conservar a energia do organismo (CARRILLO *et al.*, 2017; LAM; MAPLETOFT; MILLER, 2016).

Contudo o processo inflamatório pode ter consequências patológicas, em quase todos os tecidos, entre eles o sistema nervoso central (SNC) é especialmente sensível a inflamação, devido às dificuldades de regeneração dos neurônios. A neuroinflamação é particularmente perigosa e pode resultar em dano permanente ao SNC. Como um mecanismo de defesa natural, células específicas como as micróglias, protegem o tecido do SNC. As micróglias são as principais células imunitárias residentes no cérebro, onde constantemente examinam o microambiente do SNC, verificando a presença de patógenos e sinais de perigo e produzindo fatores que influenciam astrócitos circundantes (outro tipo de célula glial com funções de suporte) e neurônios. Quando estimuladas por agentes patogênicos ou sinais imunológicos, as micróglias tornam-se ativadas e respondem rapidamente, por sua vez, destruindo os patógenos e reduzindo os danos ao SNC (LAM; MAPLETOFT; MILLER, 2016).

Ao contrário dessa ação homeostática protetora, a inflamação tem sido observada em uma infinidade de doenças e seu impacto nos distúrbios neurológicos tem sido proposto como uma das principais causas de progressão da doença nos últimos anos. Portanto, a ativação excessiva de células microgliais, neuroinflamação excessiva, tem sido implicado em doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), a Esclerose Múltipla (EM) e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (GLASS *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2019).

### **1.2 Epidemiologia e aspectos econômicos da doença de Parkinson**

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a DA. Sabe-se que o

número total de pessoas vivendo com essa doença em todo o mundo é de 7-10 milhões, no entanto, devido ao envelhecimento geral da população, é esperado que o número de pacientes com DP dobre até 2030 (MAHAJAN *et al.*, 2016). A DP é considerada uma doença multifatorial que é causada, na maioria dos casos, pelos efeitos combinados de vários fatores, incluindo os genéticos e ambientais. Aproximadamente 10-15% dos pacientes com DP relatam uma história familiar de DP entre os parentes em primeiro grau (MAHAJAN *et al.*, 2016; ELBAZ *et al.*, 2015).

A DP acomete homens e mulheres, na faixa etária de 55 a 65 anos, no entanto a maior ocorrência dessa doença é no sexo masculino. É considerada cosmopolita, uma vez que não apresenta distinção de classes sociais (LIMONGI, 2001). Em alguns casos, a DP pode manifestar-se também em indivíduos com menos de 40 anos, caracterizando o Parkinsonismo Precoce (BARBOSA; SALLEM, 2005). Assim, é possível teorizar que a DP pode provocar um impacto nas estruturas econômicas, sociais e de saúde, o que necessitará de um maior conhecimento acerca da DP e um melhoramento do planejamento de saúde pública. Os dados referentes à epidemiologia da DP são importantes, uma vez que podem fornecer dados quanto à sua ocorrência, etiologia e informações sobre planejamentos na saúde pública (STEIDL; ZIEGLER; FERREIRA, 2007).

Estudos epidemiológicos atestam que, com a evolução da idade, há um crescimento da prevalência da DP, aumentando progressivamente em até dez vezes por volta dos 50 e 80 anos. Dados nacionais estimam que a expectativa de vida no Brasil, em 2030, será de 78,6 anos e, em 2060, de 81,2 anos. O que significa dizer que teremos um maior número de idosos e, portanto, de casos de DP no Brasil. Esses números são alarmantes, pois considerando-se que a doença pode atingir pessoas em idade economicamente ativa, em idade produtiva e o fato de tratar-se de doença crônica, significa que os dados impactam os setores econômico, previdenciário, social e de saúde pública e privada. Esses pacientes consumirão mais os sistemas de saúde, necessitarão do uso de medicamentos por toda a vida, aumentando as chances da necessidade de internação hospitalar, além de necessidade de acompanhamento multidisciplinar (neurologia, fisioterapia, fonoaudiologia, psiquiatria, psicologia, nutrição, neurocirurgia) para o pleno tratamento, o que significa uma demanda maior de atendimento e gastos com a saúde pública (PRINGSHEIM *et al.*, 2014; VILELA, 2019; SILVA *et al.*, 2021).

Estudo desenvolvido por Santos e colaboradores (2022) realizou um levantamento de dados por meio de consulta no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

(DATASUS), cuja pesquisa de dados ocorreu no período de novembro de 2021, sendo investigado durante os anos de 2016 a 2020, onde foram observadas 4.637,00 internações de pacientes com DP, sendo a região sudeste do Brasil com maior número de internações e a região norte com menor número. Foi observado também, nesse estudo que o maior número (1140 internações) de internações de pacientes com DP ocorreu no ano de 2016 e o menor (592 internações) em 2020. Em relação ao número de óbitos de pacientes por DP ocorrido no período da pesquisa, observou-se que o ano com maior registro de óbitos foi o ano de 2016. Diante dos dados encontrados nessa pesquisa, evidencia a importância da busca por novos tratamentos, uma vez que, entre os anos de 2016 a 2020, as 4.691 internações custaram aos cofres públicos mais de 18 milhões de reais, e considerando que a DP é uma doença crônica, degenerativa e de caráter progressiva do SNC, o uso de drogas com ação neuroprotetoras pode ser realmente uma alternativa relevante para a redução dos sintomas, número de hospitalizações e gasto financeiro aos cofres públicos (SANTOS *et al.*, 2022).

### **1.3 Fisiopatologia da doença de Parkinson**

As primeiras manifestações da DP são observadas a presença de um declínio no desempenho motor, afetando a prática das atividades habituais desses pacientes de forma a limitar ou até mesmo impedir práticas do dia a dia. Diante desse quadro, há um comprometimento na qualidade de vida do paciente, prejudicando o estado mental e o relacionamento com elementos do ambiente, o que compromete a participação social desses indivíduos (MALAK *et al.*, 2017).

A DP é caracterizada pela perda de neurônios na substância negra (parte compacta) (SNpc), que por sua vez leva à deficiência de dopamina na via nigrostriatal. A perda de neurônios dopaminérgicos desencadeia uma desregulação dos sintomas motores, como rigidez e instabilidade postural. Além disso, a DP é causada pela presença de um marcador histopatológico chamados corpos de Lewy (agregados anormais de proteínas encontradas no interior das células nervosas, contendo principalmente  $\alpha$ -sinucleína). Sabe-se que, cerca de 40% dos pacientes com DP, eventualmente, desenvolvem demência devido à propagação dos corpos de Lewy para o córtex cerebral e estruturas límbicas (NEVES; ALMEIDA; CAVADAS, 2016; FU; FU, 2015).

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal leva a uma intensa redução dos níveis de dopamina no estriado, bem como em outros núcleos da base. Os núcleos

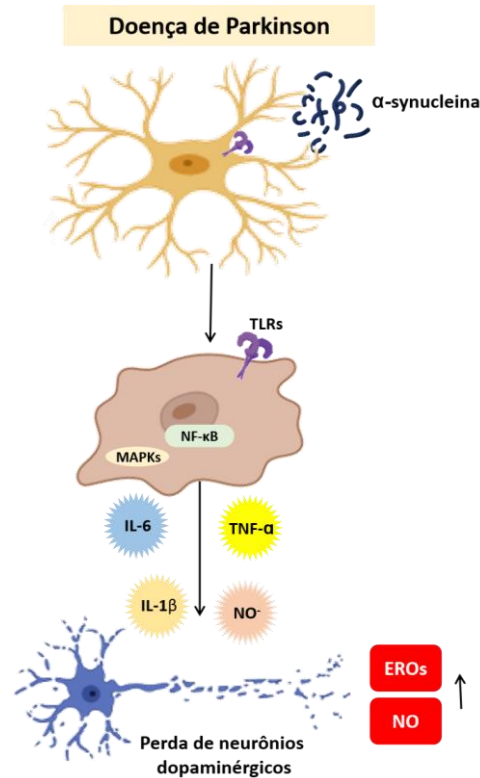


da base ou gânglios da base compõem um grupo de núcleos subcorticais que possuem como função primordial no controle dos movimentos voluntários, são eles estriado (caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico, e substância negra (parte compacta e reticulada) (DRUI *et al.*, 2014).

Adicionalmente, o hipocampo, estrutura do lobo temporal envolvida no aprendizado fisiológico e na memória, consiste em uma área que também é afetada na DP. O comprometimento do hipocampo parece estar relacionado com a disfunção cognitiva observada em alguns pacientes com DP (CALABRESI *et al.*, 2013; REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014). Nos estudos iniciais sobre a DP, não foi atribuído um papel importante ao hipocampo para essa doença, contudo, dados emergentes sugerem comunicações entre os sistemas dopaminérgicos e o hipocampo na plasticidade sináptica, memória adaptativa e comportamento motivado. O hipocampo é modulado pela entrada dopaminérgica a partir da área tegmental ventral e do bulbo olfatório e pela entrada noradrenérgica do locus coeruleus, podendo, assim, estar envolvidos na regulação motora e do humor (CEZARIO, 2017; REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014).

Diversos estudos sugerem que a perda neuronal na DP está associada a neuroinflamação crônica relacionada à micróglia e células imunes no cérebro (SONGE; KIM, 2016). Os neurônios da *substantia nigra* são particularmente vulneráveis a danos provocados pela micróglia ativada. Embora essa ativação primeiramente destine-se a proteger os neurônios dopaminérgicos, uma ativação excessiva da micróglia, em condições patológicas contribui para a progressão da DP, principalmente pela secreção de várias citocinas pró-inflamatórias e mediadores neurotóxicos como, as EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio), e assim criando um ambiente de maior estresse oxidativo. Muitos fármacos têm sido referidos como sendo neuroprotetores por prevenir a ativação da micróglia nos modelos experimentais da DP (KIM *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2022).

**Figura 1** – Esquema de processo inflamatório e consequente morte neuronal mediada pelas células microgliais na presença da  $\alpha$ -sinucleína em condições patológicas de DP.



Fonte: O autor (2022). Processo inflamatório mediado por micróglia ativada na presença da proteína  $\alpha$ -sinucleína em DP. Na presença de  $\alpha$ -sinucleína as células microgliais mudam seu estado de “repouso” (vigilante) e passam para um estado ativo (pró-inflamatório), cuja ativação é de forma excessiva, passando a liberar mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e NO que desestabilizam as funções normais dos neurônios dopaminérgicos com consequente liberação de EROs e NO gerando um ambiente de inflamação e estresse oxidativo em ciclos de reações não controlados pelo organismo. Legenda: receptores toll likes (TLRs); proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs); fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B p65); fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucinas (IL); espécies reativas de oxigênio (EROs); óxido nítrico (NO).

#### 1.4 Neuroinflamação e o estresse oxidativo na doença de Parkinson

Na neuroinflamação, células gliais são ativadas, liberando mediadores inflamatórios no interior do cérebro, com o subsequente recrutamento de células imunitárias periféricas. As micróglia, compreendem cerca de 15%-20% do total de células no cérebro, e controlam ativamente o ambiente do SNC para manter a homeostase, atender às novas necessidades fisiológicas, e responder a eventos patológicos, servindo como células do sistema imunológico para coordenar as respostas imunitárias inatas. Além da micróglia, os astrócitos, também fazem parte das células que compõem a glia e são ativados em resposta a danos no SNC (HUNG *et al.*, 2016; CHIU *et al.*, 2016).

As citocinas liberadas durante o processo inflamatório são glicoproteínas de baixo peso

molecular produzidas por diversos tipos celulares, incluindo neurônios, glia e células do sistema imune periférico. As citocinas modulam diversas funções fisiológicas e patológicas como a imunidade inata, adquirida e respostas inflamatórias, e podem afetar processos biológicos como desenvolvimento embrionário, mudanças nas funções cognitivas e progressão de doenças neurodegenerativas associadas a idade (CARVALHO *et al.*, 2016).

Já é conhecido que os níveis de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) estão aumentados no estriado e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com a DP. Além disso, em diversos modelos animais, ocorre ativação do sistema complemento e aumento na produção TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 que por sua vez, interferem nos níveis de óxido nítrico (NO), por meio do aumento da expressão da proteína iNOS, o que favorecem a indução do estresse oxidativo pelo aumento da liberação de NO (CARVALHO *et al.*, 2016).

O óxido nítrico é formado a partir da conversão da L-arginina em L-citrulina catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). A NOS é classificada em subfamílias de acordo com a localização da expressão no corpo e o modo de expressão, a saber, constitutivo ou induzível. A NOS constitutiva é detectada nos tecidos neuronais (nNOS) e nas células endoteliais vasculares (eNOS), enquanto a NOS induzível (iNOS) é expressa em vários tipos de células em condições normais e patológicas, incluindo macrófagos, células microgliais, queratinócitos, hepatócitos, astrócitos e células endoteliais e epiteliais vasculares. Com estímulos infecciosos e pró-inflamatórios, a proteína iNOS é altamente induzida a produzir NO, a partir de L-arginina em uma faixa micromolar (MURAKAMI; OHIGASHI, 2007).

**Tabela 1** - Classificação da proteína NOS de acordo com a expressão em diferentes tipos celulares e função desempenhada.

<b>Forma NOS</b>	<b>Tecido expresso</b>	<b>Tipo</b>	<b>Função</b>
nNOS	Neuronais	Constitutivo	Fisiológica
eNOS	Células endoteliais vasculares	Constitutivo	Fisiológica
iNOS	Macrófagos, micróglia, hepatócitos, astrócitos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais vasculares.	Induzível	Fisiológica ou patológica

Fonte: Murakami e Ohigashi (2007), adaptado. Legenda: Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); óxido nítrico

sintase endotelial (eNOS); óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Neste contexto, o aminoácido L-arginina também pode ser metabolizado pela arginase que converte esse aminoácido em ornitina e ureia. Portanto, tem sido sugerido que a produção de iNOS é geralmente acompanhada pela expressão de arginase, e que esta arginase pode contribuir para diminuir os níveis de NO e suas consequências pró-inflamatórias e pró-oxidativas. Ademais, podemos testar que o aumento da atividade da arginase em macrófagos marca um perfil anti-inflamatório (M2) e o aumento da expressão de iNOS marca um perfil pró-inflamatório, onde o aminoácido L-arginina é utilizado para superprodução de NO (CECÍLIO *et al.*, 2011).

Estudos anteriores descobriram que o NO desempenha um papel importante no sistema nervoso central sob ambos os aspectos fisiológicos e patológicos. O papel do NO na neuroinflamação foi definido em modelos animais onde este neurotransmissor pode modular o processo inflamatório atuando em vias regulatórias chave, como aquelas associadas a processos de excitotoxicidade induzidos pelo acúmulo de glutamato e ativação microglial. Portanto, várias linhas de evidência indicam que o NO está associado com excitotoxicidade, dano ao DNA e modificação de proteínas, que são mecanismos patogênicos comuns envolvidos em múltiplas doenças neurodegenerativas (YUESTE *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a produção aumentada e incorporação de radicais livres e a capacidade dinâmica de um biosistema para desintoxicar intermediários reativos. Os radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo são uma das características comuns em vários modelos experimentais de doenças. Eles afetam tanto a estrutura como a função de células neurais, e contribuem para uma ampla gama de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP e DA (JIANG; SUN; CHEN, 2016). Por isso, os antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução (AYOKA *et al.*, 2022). Por tanto, para mimetizar essas condições de aumento de estresse oxidativo e neuroinflamação, utiliza-se na pesquisa os modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, na tentativa de decoberto de novos fármacos eficazes e seguros.

### **1.5 Modelos experimentais *in vitro* de neuroinflamação**

Cultura de células e de tecidos são utilizados, principalmente, em pesquisa básica

aplicada como modelos de neuroinflamação. Como exemplo, podemos citar estudos sobre testes de toxicidade, na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, na engenharia genética e terapia gênica. Além disso, as células em cultura têm sido utilizadas como modelo de estudo dos efeitos de compostos endógenos e xenobióticos sobre as células e no processo de envelhecimento. Portanto, os estudos prévios *in vitro* auxiliam na redução do número de animais utilizados na pesquisa, pois possibilitam a elucidação de mecanismos de ação das drogas em estudo, seleção de novas drogas e presença ou ausência de toxicidade (MORALES, 2008; RYAN, 2011).

No início dos anos de 1930 foram descritas as culturas de células microgлияis. No entanto, a utilização de culturas para estudar as funções da micrógлия, só ocorreu, posteriormente ao desenvolvimento e melhoramento do método para a obtenção de grandes quantidades de culturas microgлияis. O aumento do rendimento e a homogeneidade das células em cultura permite a rapidez na obtenção de dados em comparação com a maioria dos experimentos realizados *in vivo* (STANSLEY; POST; HENSLEY, 2012).

Atualmente, existem muitos modelos de micrógлия e linhagens de células microgлияis usadas para investigar fenômenos neuroinflamatórios. Estes incluem culturas primárias da micrógлия, e culturas de células microgлияis imortalizadas, que podem ser, ou não, transformadas por retrovírus. Estes modelos de cultura compartilham semelhanças com as células microgлияis primárias, teciduais, como o estado de ativação, fatores liberados após estímulo, motilidade e outros componentes cruciais que caracterizam a micrógлия, que não podem ser suficientemente examinados *in vivo*. Por outro lado, são separados por diferenças essenciais como aumento do rendimento e homogeneidade da cultura que devem ser levadas em consideração, na escolha de um modelo adequado para a investigação da neuroinflamação (STANSLEY; POST; HENSLEY, 2012).

A micrógлия em cultura primária apresenta um estado inativado e outro ativado. Em relação a forma inativa, verificamos um estado de “repouso”, ou o estado "ramificado", que desempenha funções de vigilância. Já na forma ativa, podem existir dois formatos, chamados de M1 e M2. O M1 está relacionado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e mediadores neurotóxicos, como EROs e ERNs, em resposta a estímulos por LPS (lipopolissacarídeo) ou IFN- $\gamma$  (interferon-gama), dentre outros estímulos. E o M2, chamado de estado amebóide, a micrógлия exerce ação anti-inflamatória através do bloqueio da liberação de citocinas pró-inflamatórias, a ingestão de detritos, a promoção de reparação de

tecidos e liberação de fatores neurotróficos. O pesquisador pode controlar esses dois estados durante a experimentação, dependendo do seu objetivo de trabalho (STANSLEY; POST; HENSLEY, 2012; VARNUM; IKEZU, 2012).

Entre as culturas imortalizadas, ambas as linhas N9 e BV-2 têm sido usadas extensivamente na pesquisa relacionada com distúrbios neurodegenerativos. São derivadas de ratos e de camundongos, respectivamente. Estudos realizados demonstraram que a linhagem BV-2, quando estimulada por LPS, é capaz de secretar citocinas pró-inflamatórias, onde verificaram que o nível de IL-1 $\beta$  aumentou de forma dependente da dose (BLASIL *et al.*, 1990).

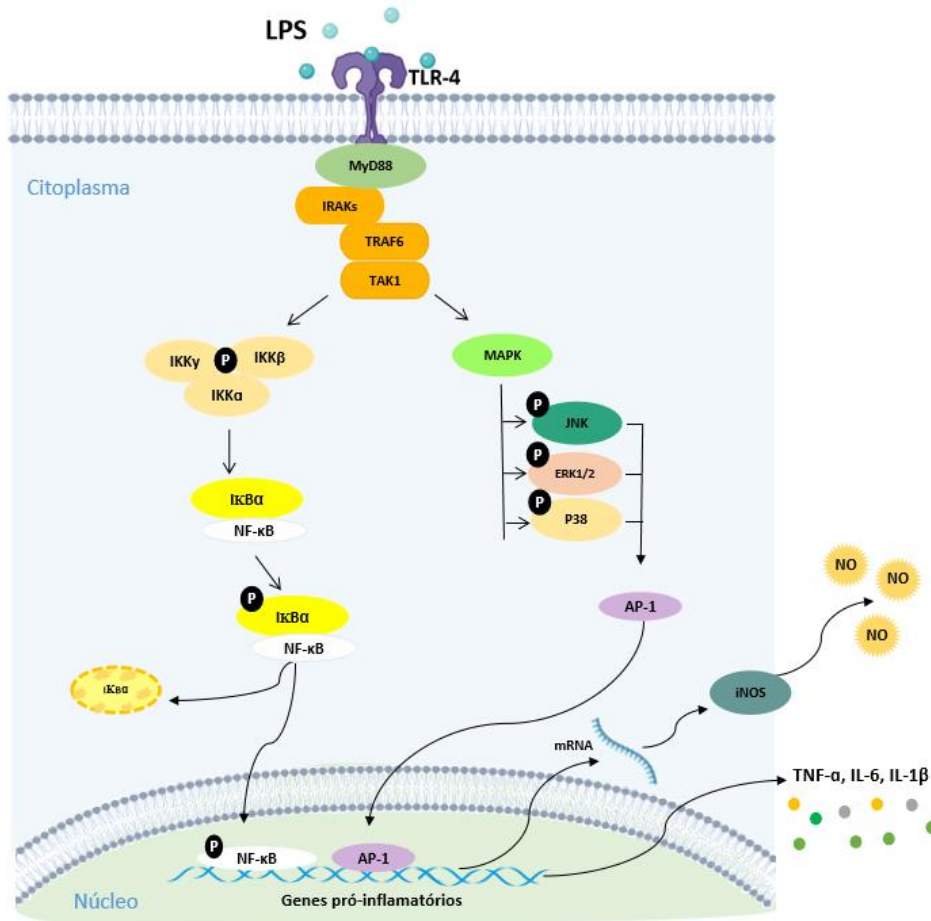
O LPS é encontrado na membrana externa de bactérias Gram-negativas, atuando como uma endotoxina que se liga a receptores toll likes (TRLs), como o TLR-4 (IMAI *et al.*, 2011; LIU; BIND, 2011; KUMAR *et al.*, 2014). O TLR-4 induz a secreção de mediadores pró-inflamatórios, eventualmente causando lesão neuronal. O NO secretado pela micróglia ativada têm sido relatado como fator crucial para a progressão da neuroinflamação. O NO é gerado através da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). A expressão de iNOS é regulada por meio de vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B p65) (KIM *et al.*, 2013).

As MAPKs, incluindo proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), proteína quinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) e proteína quinase 38 (p38), são um grupo de moléculas sinalizadoras e desempenham um papel importante na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Estudos realizados por Kim *et al.*, (2013) e Gao *et al.*, (2013) demonstraram que a regulação positiva da via de sinalização MAPK estava envolvida em vários modelos de ativação microglial. Estudos adicionais também sugeriram que a inibição efetiva da via MAPK poderia diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e, portanto, ser benéfica para a sobrevivência neuronal (HAN *et al.*, 2014; DANG *et al.*, 2014).

Outra via ativada pela presença da ligação do LPS ao TLR-4 é a do NF- $\kappa$ B p65, que demonstrou controlar as respostas inflamatórias nas células microgliais. A ativação de NF- $\kappa$ B p65 é desencadeada pela sua fosforilação e subsequente degradação de inibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Esse processo leva subsequentemente à translocação do NF- $\kappa$ B livre para o núcleo, onde promove a expressão de genes pró-inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , dentre outras), ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A inflamação microglial, portanto, serve como um modelo importante para investigar potenciais

alvos terapêuticos para diminuir a progressão da morte celular neuronal em distúrbios neurodegenerativos (OLAJIDE *et al.*, 2013).

**Figura 2** – Esquema das vias ativadas após exposição ao LPS a cultura de células microgliais.



Fonte: DE ARAÚJO *et al.*, 2022, com modificações. Mecanismo de sinalização na neuroinflamação induzida por LPS em células BV-2. A ativação do receptor toll-like 4 (TLR-4) com LPS leva à ativação das vias NF-κB p65 e MAPKs. O complexo IKK fosforila IκBα, o que leva à degradação de IκBα e subsequente translocação nuclear de NF-κB p65. Ao mesmo tempo, a via MAPK (JNK, P38 e ERK1/2) regula a transcrição de mediadores inflamatórios através da ativação do fator de transcrição AP-1. A ativação de NF-κB e AP-1 resulta na expressão de iNOS e na produção de mediadores pró-inflamatórios. Legenda: IKK: complexo de quinase IκB; IκBα: inibidor de capa B; P: Fosfato; NF-κB: Fator kapa nuclear B; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; ERK: quinase reguladora de sinal extracelular; AP-1: proteína ativadora 1.

## 1.6 Modelo animal de doença de Parkinson

Os modelos animais representam uma ferramenta muito importante para estudar os mecanismos patogênicos e estratégias terapêuticas em doenças humanas. Tradicionalmente, os

modelos animais de DP têm contado com a destruição química rápida da via dopaminérgica nigroestriatal, resultando em uma depleção de dopamina no estriado que reflete um estágio avançado da doença. Através da utilização de um modelo animal, a deficiência de dopamina foi associada com sintomas de DP, e a levodopa (dihydroxyphenylalanine ou L-DOPA) foi usado pela primeira vez para compensar o déficit de dopamina no estriado, e ainda continua sendo o padrão ouro de tratamento de DP (VISANJI *et al.*, 2016; GANDHI; SAADABADI, 2022).

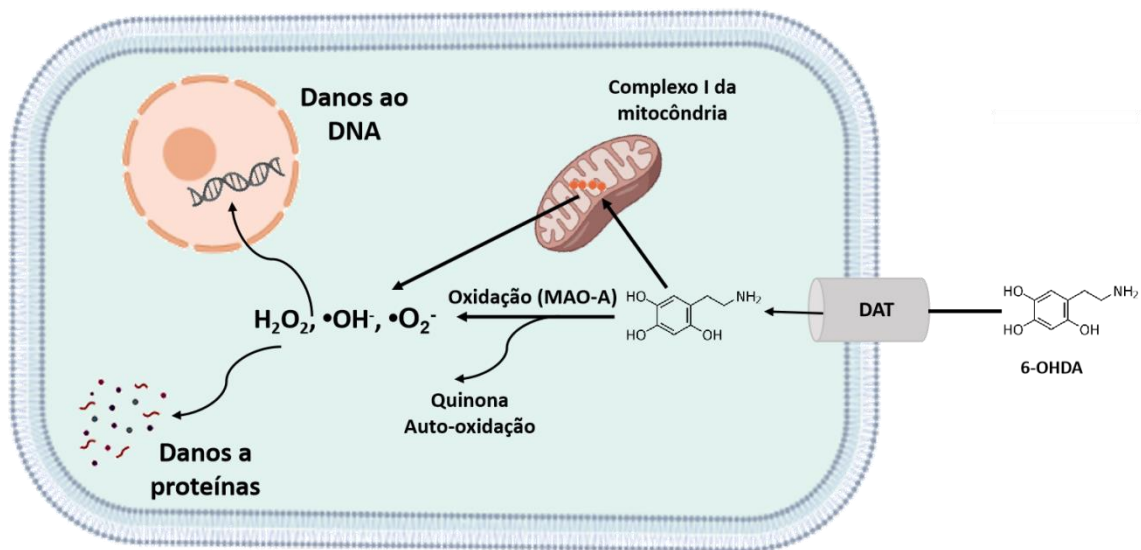
No entanto, sabemos que a levodopa reduz apenas os sintomas, e não é capaz de diminuir a progressão da doença. Estudos têm relatado efeitos colaterais relacionados a dose e a utilização a longo prazo da levodopa, onde é necessário aumentar a dose para obter o mesmo efeito ou mesmo suspender a medicação devido a efeitos secundários indesejáveis. Portanto, seria relevante o estudo de novas estratégias farmacológicas para a DP, através dos modelos experimentais existentes, que sejam capazes de diminuir a progressão da doença, e permitir ao paciente com DP um prolongamento do seu tratamento com levodopa, diminuindo a progressão da doença, sem a necessidade de aumentar ou suspender a dose utilizada (JANCOVIC; AGUILAR, 2008; ALIREZAEI *et al.*, 2015).

Modelos animais de DP baseados na destruição induzida por toxinas da via nigroestriatal provaram ser altamente eficazes na detecção de novas abordagens ao tratamento e na prevenção ou reversão de flutuações motoras e complicações motoras que ocorrem durante a terapia e como resultado da progressão da doença. Atualmente, vários modelos animais com toxinas estão sendo utilizados em primatas e roedores, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), podendo ser utilizados também pesticidas, por exemplo rotenona e paraquat. Existem algumas desvantagens no uso desses modelos, como por exemplo, no modelo utilizando a 6-OHDA não verificamos a formação de corpos de Lewy, marca histopatológica presente em pacientes com DP, outro exemplo que podemos citar é a alta toxicidade da neurotoxina MPP+, formada a partir do seu precursor MPTP, pois essa molécula consegue ultrapassar a BHE, e a utilização crônica dessa toxina pelos pesquisadores representa risco de contaminação, além disso, podemos destacar a alta taxa de mortalidade de roedores na utilização do MPTP, pois os roedores são mais sensíveis a essa toxina, no entanto são modelos animais utilizados atualmente essenciais para o estudo de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da DP. Eles abriram portas relevantes para aumentar nossa base de conhecimento dos eventos que podem levar ao processo neurodegenerativo da DP (LEWIS; PRZEDBORSKI, 2012; NOURMOHAMMADI *et al.*, 2022).



A caracterização do análogo hidroxilado da dopamina, 6-OHDA, como uma toxina indutora da degeneração de neurônios dopaminérgicos no trato nigro-estriatal, levou a ser uma ferramenta amplamente utilizada para induzir parkinsonismo em roedores. A 6-OHDA não atravessa com eficiência a barreira hematoencefálica e, portanto, requer injeção direta no cérebro. Após a injeção, a 6-OHDA entra nos neurônios dopaminérgicos, utilizando um sistema transportador de dopamina (DAT), que inicia a degeneração por meio de uma combinação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. A 6-OHDA, é oxidada pela enzima monoamina A (MAO-A) e pode ainda se auto-oxidar, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que danificam proteínas e o material genético, levando a morte neuronal. Visto isso, podemos verificar que a DP apresenta características fisiopatológicas relacionadas com aumento da inflamação e estresse oxidativo, esses processos podem ser neutralizados com a utilização de um composto com potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório (KABUTO; YAMANUSHI, 2011; BALTAZAR; FLORES; OLIVO, 2017).

**Figura 3** – Mecanismo de ação do modelo de DP induzido por 6-OHDA.



Fonte: O autor (2022). Nesse modelo a 6-OHDA, que consiste em um análogo da dopamina entra nas células neuronais através do transportador de dopamina (DAT), que uma vez dentro da célula a 6-OHDA é oxidada pela monoamina oxidase A (MAO-A) formando quinonas e liberação de  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  e  $O_2^\bullet^-$ , sofre também auto-oxidação que culmina na formação de EROs. A 6-OHDA também pode interagir com o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, que bloqueia o processo de respiração celular e passa a liberar EROs, que consequentemente causam danos ao DNA e proteínas. Legenda: ácido desoxirribonucleico (DNA); monoamina oxidase A (MAO-A); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ); ânion superóxido ( $O_2^\bullet^-$ ).

Portanto testar produtos naturais, que apresentem atividades antioxidante e anti-inflamatória, por meio da utilização dos modelos experimentais, seria uma importante contribuição para entendermos melhor a fisiopatologia dessa doença e contribuir para o tratamento dos pacientes com mal de Parkinson.

### **1.7 Fitoterápicos e fitofármacos**

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas continuam sendo utilizadas e estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (MOTTA *et al.*, 2013). Dentre as principais contribuições destas na atenção aos pacientes podemos relacionar, *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Valeriana officinalis*, que se destacam no mercado farmacêutico internacional.

Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a). Estes fármacos, sempre apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 22 bilhões anualmente. O mercado nacional de fitoterápicos é composto por 119 empresas que possuem registro de seus produtos junto à ANVISA, sendo encontradas informações de movimentação de cerca de 1,8 milhão de reais ao ano. De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (Abifisa), o mercado de fitoterápicos brasileiro apresentou crescimento em torno de 8% comparado ao mesmo período de 2014, que havia crescido 6,1% em relação ao ano anterior. Ou seja, o segmento vem ampliando o patamar de crescimento (FEBRAFARMA, 2007; ZUANAZZI, 2010; FIRPO, 2015).

Dentre os fitofármacos há a classe dos alcaloides que constituem uma das classes de metabólitos secundários mais rica em termos de bioatividade, destacando emetina (amebicida e emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgico), vincristina e vinblastina (antitumoral), codeína (antitussígeno) e morfina (hipnoanalgésico) (HENRIQUES *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2016).

Assim o uso de plantas, como fonte de novos fármacos mostra um grande potencial para utilização em várias doenças e podem ser de grande importância para a indústria farmacêutica. Por exemplo, uma análise da origem das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 mostrou que produtos naturais ou drogas derivadas de produtos naturais compreendiam 28% de todas as novas substâncias químicas lançadas no mercado. Além disso, 24% destes eram compostos miméticos sintéticos ou naturais, com base no estudo de farmacóforos relacionados aos produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2012 e 2013; MORAES, 2015).

Produtos à base de plantas, têm sido o foco de diversos estudos, porque eles têm apresentado efeitos benéficos sobre o sistema nervoso central e envelhecimento cerebral e possuem componentes bioativos potenciais para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas (KIM *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2022), incluindo *Ginkgo biloba* marcadores: ginkgoflavonoides e terpenóides, em estudo realizado por Kaur; Sharma e Nehru (2018) com o extrato padronizado apresentou atividade anti-inflamatória ao suprimir a ativação de astrócitos marcados com (GFAP), além da diminuição da expressão do NF- $\kappa$ B e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), no mesmo estudo o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* foi eficaz contra a perda neuronal hipocampal induzida por trimetilestano, *Camellia sinensis* (chá-verde) e seus ativos epicatequina e galato de epigallocatequina, em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstraram efeito neuroprotetor em modelo de DP induzido por 6-OHDA (PINTO *et al.*, 2015) e ativos de *Amburana cearensis*, como amburosídeo A (LEAL *et al.*, 2005) e cumarina (LUCETTI, 2010).

### **1.8 *Amburana cearensis* e seus ativos como fonte em potencial de fármacos anti-inflamatórios/neuroprotetores**

Árvore típica do semiárido brasileiro, a *Amburana cearensis* A. C. Smith (Fabaceae), é popularmente conhecido como "cumaru" ou "amburana-de-cheiro". A sua casca do tronco e sementes são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de reumatismo, tosse, bronquite e principalmente asma (CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010). Vários compostos têm sido isolados a partir da casca do tronco de *A. cearensis*, incluindo cumarina, ácido vanílico, flavonoides, glicosídeos fenólicos como amburosídeo A e B (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Estudos realizados têm demonstrado que o extrato seco da *A. cearensis* e seus ativos (cumarina- CM, ácido vanílico- AV e amburosídeo- AMB), apresentam atividades antioxidante e anti-inflamatória em diversos modelos experimentais, incluindo de DP (PEREIRA *et al.*, 2017;

LAEL *et al.*, 2011; AMARAL., 2017; PEREIRA *et al.*, 2009). Leal e colaboradores (2005), realizaram um estudo em células mesencefálicas de ratos após exposição à neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), demonstrando em seus resultados que, o produto bioativo testado amburosídeo A (AMB) da *A. cearensis* apresentou efeito neuroprotetor significativo, agindo como um composto antioxidante, sugerindo que esta biomolécula poderia proporcionar benefícios como agente terapêutico em doenças neurodegenerativas tais como DP.

Estudos anteriores desenvolvidos por Leal e colaboradores (2003b, 2008), demonstraram que a CM e AMB apresentaram atividades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes em modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata e peritonite induzidos por carragenina) em roedores, e de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCL4) nas doses a dose de 20 a 50 mg/kg, v.o (via oral), respectivamente, além de outros efeitos farmacológicos.

Estudos realizados por Leal e colaboradores (2003a) demonstraram a segurança do extrato hidroalcolico da casca do caule de *A. cearensis* silvestre avaliando a toxicidade pré-clínica aguda e subcrônica por via oral em ratos *wistar* machos e fêmeas. Nesse estudo, foi observado que o extrato hidroalcolico de *A. cearensis* silvestre (EHA) (500 mg/Kg, v.o) não promoveu alterações sobre parâmetros analisados tais como bioquímicos, hematológicos e reprodutivos, embora na avaliação toxicológica subcrônica nenhum efeito tóxico significativo ou morte foi observado, o EHA (500 mg/kg, v.o.) administrado diariamente durante 4 semanas, causou aumento nos níveis da alanina transaminase (ALT). A presença de CM na planta contribui para o aumento de ALT observado no grupo tratado com o EHA, como já foi demonstrado esse efeito em roedores em trabalhos anteriores da literatura (LAKE, 1999; COHEN, 1979). Foi observado também em ratos um aumento no número de neutrófilos, estando possivelmente relacionado a algum processo inflamatório agudo adquirido pelos animais durante o período de tratamento (Leal *et al.*, 2003a).

Em estudos realizados com o extrato das sementes da *Amburana cearensis* (0.01–2000 g/ml), cujo componente majoritário identificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi CM, verificaram que o extrato não apresentou toxicidade avaliado pelo teste do MTT e tem efeito neuroprotetor em células PC-12 (linhagem neuronal) expostas ao glutamato que pode estar relacionado a suas propriedades antioxidantes (PEREIRA *et al.*, 2017).

A crescente demanda na exploração econômica de *A. cearensis* silvestre, principalmente

pelo seu uso madeireiro e medicinal, tem contribuído para uma diminuição da disponibilidade dessa espécie, atualmente considerada ameaçada de extinção (RAMOS *et al.*, 2004; CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; AMERICAS REGIONAL WORKSHOP, 2013). Assim, estudos que priorizem a planta cultivada vêm sendo realizados, principalmente aqueles voltados para domesticação da espécie com finalidade de preservação. Paralelamente, outros estudos estão sendo conduzidos com o intuito de caracterizar química e farmacologicamente a espécie cultivada, a fim de buscar evidências científicas que apoiem a utilização da planta cultivada na produção de formulações farmacêuticas de *A. cearensis*.

Os estudos químicos da *A. cearensis* cultivada foram realizados por CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA (2010), na qual eles identificaram 10 compostos, sendo 4 inéditos no gênero, como: ácido p-hidroxi-benzóico, aiapina e os estereoisômeros (E) e (Z) do ácido o-cumárico glicosilado. Os demais compostos identificados também foram encontrados na casca do caule da árvore silvestre como: cumarina, isocampferídio, amburosídeos A e B, ácido vanílico e ácido protocatecuico.

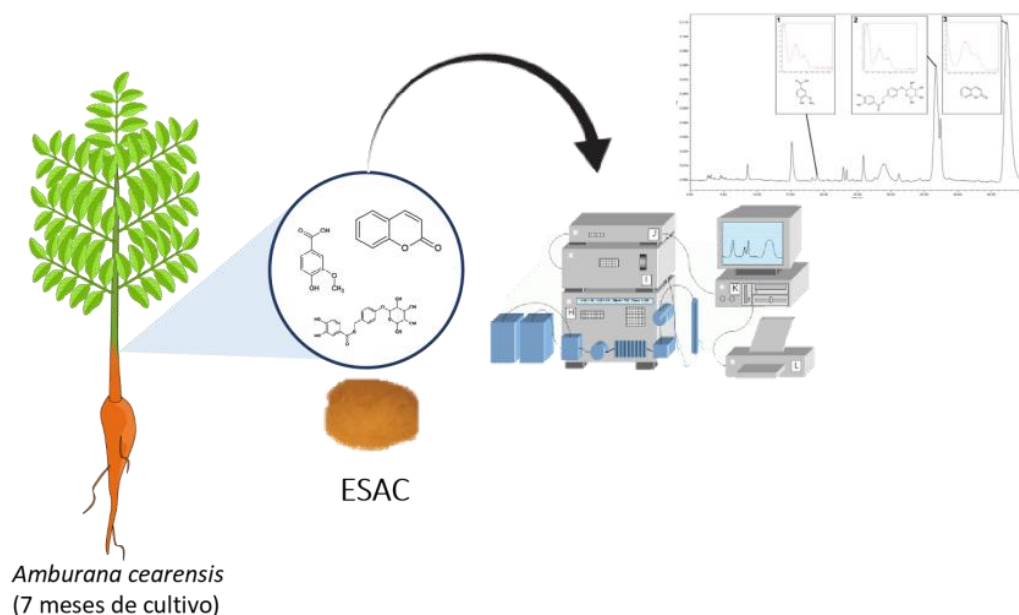
Estudos realizados (CANUTO *et al.*, 2008; CANUTO e SILVEIRA, 2010) permitiram a avaliação dos parâmetros agronômicos sobre o desenvolvimento do cumaru cultivado colhido em diferentes períodos do ano e a determinação do seu perfil de crescimento e condições ideais de cultivo. A prospecção química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos etanólicos de *A. cearensis* (parte aérea e xilopódio) coletada aos 4, 7 e 9 meses permitiram a identificação e quantificação de seus compostos majoritários, ácido vanílico (AV) e cumarina (CM), e permitiram a identificação da planta coletada aos 7 meses com maior teor de ativos em relação aos demais períodos (LEAL *et al.*, 2011). Podemos destacar ainda no estudo realizado por Amaral (2017), foram identificados no extrato produzido a partir da *A. cearensis* cultivada durante um período de 7 meses que as moléculas CM, AMB e AV foram os compostos majoritários encontrado na *A. cearensis* cultivada, assim como também no extrato produzido a partir da casca da árvore silvestre.

Estudos farmacológicos realizados com os extratos da planta cultivada (4, 7 e 9 meses) mostraram que, à semelhança do extrato hidroalcolico (EHA) da árvore silvestre, apresentam atividade antinociceptiva em camundongos. Da mesma forma que o extrato seu bioproduto AV, apresentou atividade antinociceptiva por inibição de ambas as fases do teste da formalina. Os resultados demonstraram que o ácido vanílico é em parte responsável pelas atividades farmacológicas do extrato, mas não se pode excluir a importância farmacológica de outros

constituintes químicos da planta cultivada (LEAL *et al.*, 2004, 2011).

Diante das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias apresentadas pelo extrato do cumaru seco padronizado da planta cultivada e seus ativos em estudos anteriores, essa investigação se propõe a buscar efeitos na diminuição da neuroinflamação, que possam contribuir para pesquisas em busca de um tratamento para DP, a partir de um produto natural.

**Figura 4** – Esquema mostrando a *A. cearensis* aos 7 meses de cultivo e caracterização do extrato seco padronizado produzido a partir das folhas, caule e xilapódio, cujo ativos são CM, AV e AMB.



Fonte: O autor (2022). *Amburana cearensis* aos 7 meses de cultivo e ativos (CM, AMB e AV) analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

## 2- JUSTIFICATIVA

A doença de Parkinson é uma das doenças neurológicas mais comuns e encontra-se em franco crescimento na população impulsionado pelo aumento da longevidade. O tratamento atual padrão-ouro com L-DOPA não é capaz de impedir nem retardar a progressão dessa doença, tratando apenas os sintomas clínicos. A médio prazo, provoca efeitos secundários graves que levam inclusivamente à interrupção da sua administração. Estes fatos urgem a procura de formas alternativas de tratamento, com efeito sobre a progressão da doença e com maior tolerabilidade a longo prazo. Um dos fatores com maior impacto na evolução da doença é a neuroinflamação, em particular a ativação de células da micróglia, que pretendemos estudar. Diante disso, nosso grupo tem investigado há mais de uma década produtos derivados e moléculas de *A. cearensis* incluindo AMB, AV e CM, com determinação dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, no entanto, existem poucos estudos do cumaru no SNC. Podemos destacar, o estudo anterior nosso laboratório que determinou a ação neuroprotetora do AMB em células mesencefálicas de ratos após exposição à neurotoxina 6-OHDA. Dessa forma, diante das atividades farmacológicas promissoras do extrato e moléculas de *A. cearensis* e baixa toxicidade da planta, a hipótese do estudo é que as atividades anti-inflamatória e antioxidante do extrato seco e constituintes químicos de *A. cearensis* (priorizando a planta cultivada) determinadas em modelos de inflamação não relacionados ao SNC, irão possivelmente refletir num possível efeito anti-neuroinflamatório e/ou neuroprotetor destes, e que são de interesse para o tratamento da doença de Parkinson.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Estudar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do extrato seco de *A. cearensis* cultivada, e seus ativos (CM, AV e AMB) em modelos experimentais de neuroinflamação e doença de Parkinson.

#### 3.2 Específicos

##### *In vitro*

- Investigar a atividade sequestradora de radicais livres pelo ESAC e/ou ativos (CM, AV e AMB), através da determinação da produção do ânion superóxido e radical hidroxila;
- Avaliar a citotoxicidade dos ativos (CM, AV e AMB) e do extrato seco de *A. cearensis* cultivada (ESAC), através do teste do MTT sobre células da micróglia BV-2;
- Investigar a atividade anti-inflamatória do ESAC e ativos (CM, AV e AMB) de *A. cearensis* em modelo de inflamação induzida por LPS em células microgliciais, através da determinação da concentração de nitrito, atividade da arginase, e citocinas pró-inflamatórias;
- Pesquisar o efeito do ESAC e ativos (CM, AV e AMB) de *A. cearensis* sobre a expressão do receptor TLR-4 e sobre as vias de sinalização intracelulares (iNOS, NF- $\kappa$ B p65, ERK1/2 e JNK) que estão envolvidas na ativação da micróglia por LPS;
- Estudar a viabilidade celular e produção de nitrito de células neuronais PC-12 expostas a neurotoxina 6-OHDA e ao meio condicionado de células BV-2 expostas a LPS e/ou ESAC.

##### *In vivo*

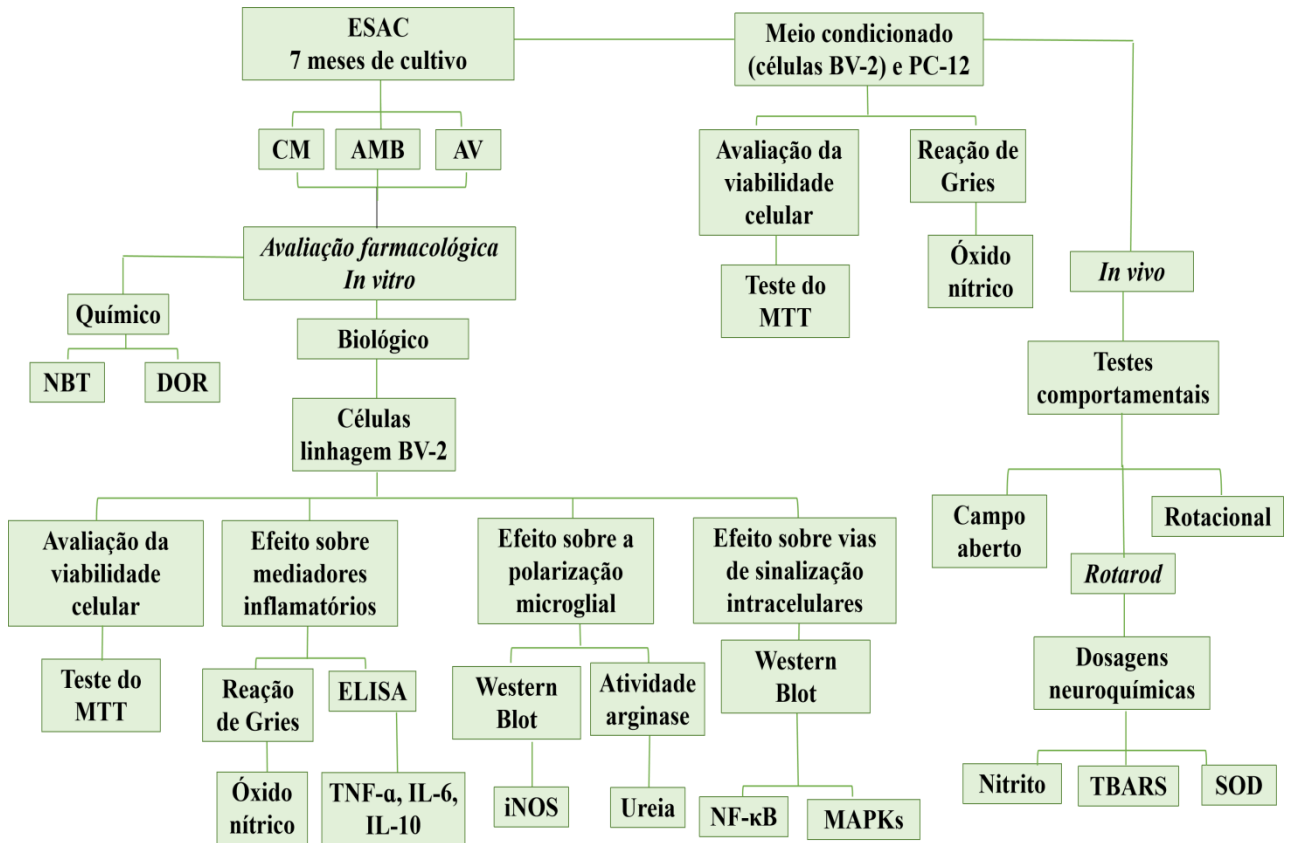
- Investigar o potencial neuroprotetor do ESAC em modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, avaliando os efeitos comportamentais;
- Avaliar o efeito do tratamento com ESAC sobre o estresse oxidativo através da determinação das concentrações de nitrito, peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado ipsilateral e contralateral de ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.



## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

**Figura 5** – Fluxograma apresentando o detalhamento do delineamento experimental



Fonte: O autor (2022). Legenda: Extrato seco de *A. cearensis* (ESAC); cumarina (CM); amburosídeo (AMB); ácido vanílico (AV); nitrotetrazolium blue chloride (NBT); deoxirribose (DOR); 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT); fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); interleucina 6 (IL-6); interleucina 10 (IL-10); óxido nítrico sintase induzível (iNOS); fator nuclear kappa B (NF-κB); proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs); superóxido dismutase (SOD); substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

### 4.2 Preparação e caracterização química de extrato seco de *A. cearensis* (ESAC)

A fim de alcançar uma alternativa sustentável para o aproveitamento econômico de *A. cearensis*, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa se concentrou também na planta cultivada de *A. cearensis*, que possui propriedades químicas e biológicas semelhantes as silvestres (LEAL

*et al.*, 2011). Sementes de *A. cearensis* foram coletadas na região de Quixeramobim, Estado do Ceará, Brasil, e o espécime comprovante (nº 52618 e 52619) foi depositado no herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. As sementes de *A. cearensis* foram cultivadas e sete meses depois a planta foi colhida dos canteiros, seca e moída, sendo utilizadas as partes aéreas e xilapódio para produção do extrato. A extração foi realizada por maceração por 24 h com etanol conforme previamente determinado pelo nosso laboratório (LIMA, 2013). O processo de secagem do extrato etanólico foi realizado em temperatura ambiente utilizando mini spray-dryer modelo LM MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O dióxido de silício coloidal foi utilizado como carreador de secagem (30% em relação aos resíduos sólidos) com vazão de alimentação de 1L/h, temperatura de entrada de 100°C e vazão de ar de 40 L/min.

### 4.3 Análise por HPLC do ESAC

Extrato seco de *A. cearensis* (ESAC) foi analisado por HPLC-PDA de acordo com o método desenvolvido anteriormente por nosso laboratório (Amaral, 2017). A análise dos três marcadores químicos (cumarina (CM), amburosídeo A (AMB) e ácido vanílico (AV)) foi realizada através de suas curvas de calibração, obtidas por injeção de padrões externos. A análise do ESAC foi realizada em coluna de fase reversa C18 (4,6 mm x 250 mm) à temperatura de 45°C. A análise por HPLC-PDA do ESAC permitiu a identificação e quantificação de ácido vanílico, amburosídeo e cumarina.

### 4.4 Substâncias químicas

O AMB foi isolado de *A. cearensis* de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Canuto e colaboradores (2010), AV, CM, Lipopolisacarídeo (LPS, de *Escherichia coli*), dimetilsulfóxido (DMSO), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), apomorfina, Trypan Blue, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), *N*-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEED), albumina do soro bovino (BSA), ácido tiobarbitúrico (TBA), deoxirribose (DOR), nitrotetrazolium blue chloride (NBT), xantina oxidase (XOD), hipoxantina (HPX), cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>), L-ácido ascóbio (vitamina C), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich, EUA, sulfanamida e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram adquiridos da Dinâmica Química Comtemporânea, Brasil. O ácido tricloracético (TCA) foi adquirido da Êxodo Científica,

Brasil.

Soro fetal bovino (FBS), penicilina/estreptomicina, meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) foram comprados da Gibco by Life Technologies, EUA. Células microgлияis (BV-2) e pheochromocytoma (PC-12) de camundongo foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil.

Os anticorpos anti-NF- $\kappa$ B p65, anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65, anti-JNK, anti-fosfo-JNK e anti-fosfo-ERK foram obtidos da Cell Signaling Technologies. O anticorpo anti-TLR-4 foi obtido da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA. Anticorpos anti-iNOS, anti-ERK e anti- $\beta$ -actina foram obtidos da Abcam Cambridge, Reino Unido. Anticorpo secundário anti-camundongo foi obtido de Bio-Rad Laboratories, CA, EUA e anti-coelho foi obtido de Sigma-Aldrich, Nova York, EUA. Os kits ELISA para TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  foram adquiridos da BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, EUA.

#### **4.5 Determinação do sequestro de radical hidroxila (DOR)**

O radical hidroxila foi medido usando o método de desoxirribose de acordo com (Zhao *et al.*, 2006) com modificações. Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA) (1 mM), EDTA (Dinâmica) (1 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, EUA) (10 mM), FeCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, EUA) (1 mM), deoxirribose (DOR) (Sigma-Aldrich, EUA) (36 mM), ESAC (100  $\mu$ g/mL), CM (100  $\mu$ g/mL), AV (100  $\mu$ g/mL), AMB (100  $\mu$ g/mL) ou 0,1% de DMSO (veículo da droga) foram adicionados a um tubo de reação, o volume final foi ajustado com tampão fosfato 25 mM (pH 7,4) e incubados por 1 h a 37°C. Adicionou-se TCA 10% e TBA 1% (preparado em NaOH 50 mM) e a solução foi aquecida em banho-maria a 85°C por 15 minutos. A absorvância foi medida a 532 nm.

#### **4.6 Determinação do sequestro de ânion superóxido (NBT)**

A geração de superóxido foi medida por uma ligeira modificação do método anterior descrito por Hodgson e Fridovich (1976) usando o sistema HPX/XOD (Sigma-Aldrich, EUA). As soluções de azul nitrotetrazólio (NBT), hipoxantina (HPX) e xantina oxidase (XOD) foram preparadas em tampão Tris-HCl. ESAC, CM, AV ou AMB em uma concentração de 100  $\mu$ g/mL ou 0,1% de DMSO, foram adicionados à solução de reação contendo tampão Tris-HCl 0,05 M, HPX 5 x 10<sup>-3</sup> M e NBT 10<sup>-3</sup> M. Em seguida, adicionou-se 1,67  $\mu$ /mL de XOD, exceto no controle negativo. A diminuição da absorvância foi determinada a 560 nm a cada minuto durante 21 min.

#### **4.7 Condições de cultivo celular linhagens BV-2 e PC-12**

As células BV-2 murinas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10%. A linhagem celular de feocromocitoma de rato PC-12 foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas até 70-80% de confluência e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.8 Ensaio de Viabilidade Celular**

Antes de realizar o teste de atividade anti-inflamatória do ESAC e dos constituintes químicos, realizamos o teste de citotoxicidade nas células BV-2. O teste do MTT avaliou a viabilidade das células BV-2 usando o método descrito anteriormente por Mosmann (1983). As células ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com ESAC, CM, AV ou AMB (5, 10, 25, 50 100 µg/mL) e 0,1% dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) (veículo da droga) por 24 h. Após o período de incubação, a solução de sal 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL) foi adicionada à solução, a placa foi incubada por 90 minutos a 37°C. Por fim, as células foram centrifugadas a 120 g por 10 minutos, o sobrenadante retirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e a absorbância de cada poço foi registrada a 540 nm, usando um leitor de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA).

#### **4.9 Mensuramento de nitrito**

A concentração de nitrito em células BV-2 induzidas por LPS foi determinada pelo ensaio de Griess (GREEN, 1981). As células ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas com ESAC, CM, AV ou AMB (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e 0,1% de DMSO (veículo da droga) e uma hora depois foi adicionado LPS (0,5 µg/mL). Após 24 h, o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 1% de ácido fosfórico e 0,1% de NEED em 1% de ácido fosfórico, 1: 1) foi adicionado ao meio celular à temperatura ambiente, 15 minutos mais tarde a absorbância a 560 nm foi medida em um leitor de placas. As concentrações de NO foram calculadas a partir da curva padrão gerada por concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

#### 4.10 Determinação da atividade da arginase

A atividade da arginase foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Corraliza *et al* (1994). Células BV-2 ( $1 \times 10^6$  células/mL), foram pré-tratadas ou não com ESAC, CM (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou AMB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) e DMSO 0,1% (droga veículo), por 1 h antes da adição do LPS (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 h as células foram lisadas com tampão contendo solução de 0,1% Triton X-100, por 30 minutos, à temperatura ambiente. A enzima foi ativada aquecendo a placa por 10 minutos a 55°C, usando o tampão de ativação enzimática (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{MnCl}_2$  10 mM). A hidrólise de L-arginina (25  $\mu\text{L}$ , 0,5 M, pH 9,7) foi induzida através da incubação do lisado (50  $\mu\text{L}$ ) com 25  $\mu\text{L}$  de L-arginina (Sigma-Aldrich, EUA) 0,5 M, (pH 9,7) durante 60 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 400  $\mu\text{L}$  do tampão contendo ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%)/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%)/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/3/7, v/v/v)). Após a adição do  $\alpha$ -isonitrosopropiofenona (25  $\mu\text{L}$ , 9%) e aquecimento por 30 minutos a 95°C a concentração de ureia (produto final da reação) foi determinada por análise espectrofotométrica (540 nm). As concentrações de ureia foram interpoladas a partir da equação linear obtida a partir da curva padrão gerada por concentrações conhecidas de ureia (1,5 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 4.11 Ensaio de imunoabsorção enzimática

As células BV-2 foram pré-tratadas com ESAC (100  $\mu\text{g/mL}$ ), AMB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) ou CM (50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e DMSO a 0,1% (veículo da droga) por 1 h, depois estimuladas com LPS (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 no sobrenadante da cultura celular foram quantificados usando kits de ELISA disponíveis comercialmente (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A absorbância a 450 nm foi medida usando um espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA). As concentrações de citocinas foram interpoladas a partir da equação linear obtida a partir da curva padrão gerada por concentrações conhecidas de citocinas (7,5 a 1000 pg/mL).

#### 4.12 Extração de proteínas e análise de Western blot

As células micrógliais BV-2 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram pré-tratadas com ESAC (100  $\mu\text{g/mL}$ ), AMB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) ou CM (50,100  $\mu\text{g/mL}$ ) e DMSO a 0,1% (veículo da droga) por 1 h, LPS (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado e as células foram incubadas por 1 h (marcação de eventos de fosforilação- NF- $\kappa\text{B}$  p65, MAPKs e TLR-4) ou 24 h (iNOS). As células foram colhidas e as

células aderentes foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelado. Em seguida as células foram centrifugadas à 130 g, 5 minutos, 4°C. As proteínas celulares foram extraídas por incubação com tampão de ensaio radioimunoprecipitação (RIPA) contendo inibidor de protease (1:20) (P2714, Sigma-Aldrich, New York, USA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1: 50) e inibidor de fosfatase (1: 50) (ab201112, Abcam®, Cambridge, UK). O lisado celular foi centrifugado a 12000 × g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi mantido como extrato de proteínas. A concentração de proteína foi definida com o kit BCA (BioRad Laboratories, CA, USA) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e a concentração de proteínas de todas as amostras foi normalizada com tampão *Laemmli* (glicerol 40%, SDS 2%, Tris-HCl 0.2 M e 0,005% azul de Coomassie, pH 6,8). Quantidades iguais de proteína (30 µg) de cada amostra foram submetidas a 7,5 - 10% de SDS-PAGE (120 V, 90 minutos) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (70 V, 2 h). Após bloqueio à temperatura ambiente com 5% de leite desnatado ou BSA a 5% por 1 h, as membranas bloqueadas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpos primários contra anti-fosfo-NF-κB p65 1:1000 (Ser536, #3033S), anti-NF-κB p65 1:2000 (#6956S), anti-fosfo-ERK1/2 1:1000 (Thr202/Tyr204, #9101S), anti-ERK1/2 1:1000 (ab36991), anti-fosfo-JNK 1:1000 (Thr183/Tyr185, #9255S), anti-JNK 1:2000 (#9252S), anti-iNOS 1:1000 (ab178945), anti-TLR-4 1:200 (482300) e anti-β-actina (1:5000) (ab8226), onde foram adicionados às membranas de acordo com as recomendações do fabricante. Após três lavagens com TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH7,6), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-coelho (1:5000) (SAB3700956) ou anti-camundongo (1:5000) (#170-6516)) durante 2 h à temperatura ambiente. As bandas de proteína foram visualizadas usando reagente de quimioluminescência (Western Blot Clarity™ ECL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) (Bio-Rad, EUA) em um sistema de imagem (ChemiDoc MP, Bio-Rad, EUA) (ZHAO *et al.*, 2018), e os níveis de proteína foram analisados usando o software ImageLab 6 (Bio-Rad, EUA) e normalizadas com β-actina ou proteínas totais.

**Tabela 2** - Anticorpos primários utilizados para Western blot

Anticorpos primários	Diluição	Marca
Anti-fosfo-NF- $\kappa$ B p65	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-NF- $\kappa$ B p65	1:2000	Cell Signaling Technologies
Anti-fosfo-ERK1/2	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-ERK1/2	1:1000	Abcam
Anti-fosfo-JNK	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-JNK	1:2000	Cell Signaling Technologies
Anti-iNOS	1:1000	Cell Signaling Technologies
Anti-TLR-4	1:200	Invitrogen
Anti- $\beta$ -actina	1:5000	Abcam

Fonte: O autor (2022).

**Tabela 3** - Anticorpos secundários utilizados para Western blot

Anticorpos secundários	Diluição	Marca
Anti-coelho	1:5000	Bio-Rad Laboratories
Anti-camundongo	1:5000	Sigma-Aldrich, EUA

#### 4.13 Meio condicionado de células BV-2 expostas ao LPS em células PC-12 com a presença de 6-OHDA.

As células BV-2 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e pré-tratadas com ESAC (100  $\mu$ g/mL) por 1 h, e depois estimuladas com 0,5  $\mu$ g/mL de LPS por 24 h. Após o pré-tratamento com ESAC e a estimulação com LPS, o meio de cultura das células tratadas com ou sem LPS na presença ou na ausência de ESAC foi coletado. Após centrifugação a  $800 \times g$  por 10 minutos e remoção de resíduos celulares, o sobrenadante foi utilizado como meio condicionado. Para detectar a morte das células PC-12 diante da presença do meio condicionado, as células PC-12 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/mL por 24 horas, após esse período receberam um tratamento com meio condicionado e/ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (10  $\mu$ g/mL) por 24 h a 37°C. A viabilidade das células PC-12 foi medida pelo ensaio MTT descrito (subitem 4.8). Para o ensaio de NO foi

seguido o protocolo conforme descrito no subitem 4.9, seguindo os procedimentos de incubação anteriormente mencionados para as duas culturas de células (BV-2 e PC-12).

#### **4.14 Modelo *in vivo***

##### **4.14.1 Animais**

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, livres de patógenos específicos (SPF) pesando entre 250-300 g, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à alimentação e à água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob o número 9597060218 e todos os procedimentos experimentais foram realizados em estrita conformidade com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

##### **4.14.2 Drogas**

As seguintes substâncias foram utilizadas: 6-OHDA (Sigma-Aldrich, EUA), Cloridato de ketamima 10% (Vetanarcol®, LaboratóriosKonig S.A, Argentina), Cloridato de xilazina 2% (Kensol® Laboratórios Konig S. A, Argentina), apomorfina (Sigma-Aldrich, EUA) e Levodopa (100 mg de Levodopa + 25 mg de Cloridrato de benserazida/EKSON). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

#### **4.15 Injeção unilateral com 6-OHDA**

Para a cirurgia, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de ketamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após anestesia, foi verificado se o animal apresentava qualquer reflexo doloroso. Logo após, foram realizados à tricotomia da região superior da cabeça e posteriormente fixado no aparelho estereotáxico. Os animais receberam, através de cirurgia estereotáxica, duas injeções de 1  $\mu$ L da solução de 6-OHDA (6  $\mu$ g/ $\mu$ L) em um total de 12  $\mu$ g/animal dissolvida em solução de ácido ascórbico a 0,02% em salina 0,9%. As injeções foram administradas no estriado direito, de acordo com as seguintes coordenadas (em mm) relativas ao bregma: (1) ântero-posterior (AP) + 0,5, médio-lateral (ML) -2,5, dorsoventral (DV) +5,0; (2) AP -0,9, ML -3,7, DV + 6,5 (PAXINOS; WATSON, 1986). Os animais do grupo falso-operado (FO) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos,



no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA somente salina 0,9%.

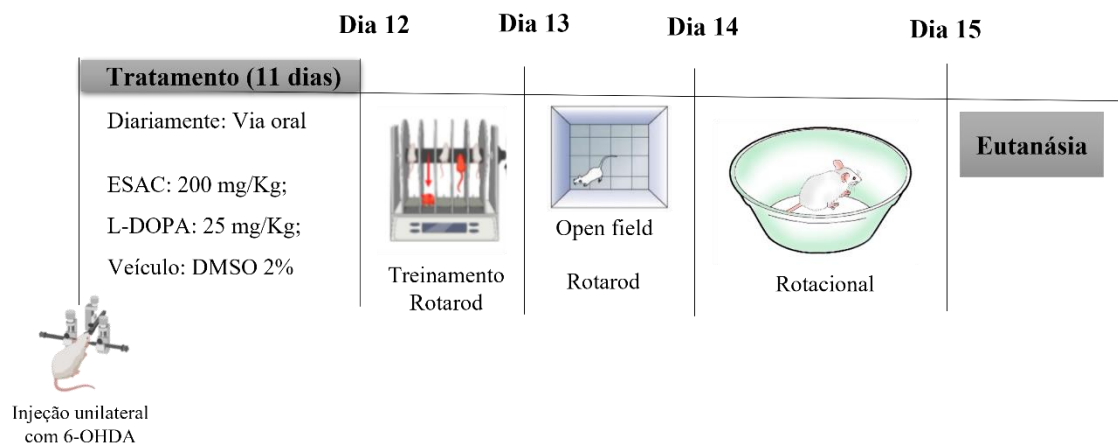
### ➤ Protocolo experimental

Os tratamentos com ESAC (200 mg/kg; dose escolhida a partir dos estudos realizados por Amaral (2017) ou levodopa (25 mg/kg) (CEZÁRIO, 2017) foram realizados por via oral (v.o), duas horas após a realização da cirurgia e por 14 dias, utilizando DMSO a 2% como veículo da droga.

Foram utilizados 50 animais divididos em 4 grupos diferentes, sendo o SHAM, tratado com DMSO 2% (veículo da droga), 6-OHDA, tratado com DMSO 2%, 6-OHDA tratado com ESAC na dose de 200 mg/Kg, e 6-OHDA tratado com levodopa (L-DOPA) na dose de 25 mg/Kg por via oral.

Os animais receberam o tratamento com ESAC (200 mg/Kg), DMSO 2% ou L-DOPA (25 mg/Kg) 2 horas depois da cirurgia estereotáxica. Nos dias que se seguiram a cirurgia, foram administradas as drogas testes e veículo da droga (DMSO 2%), 1 vez por dia até o 14º dia. No 12º dia foi realizado o treinamento do *rotarod*, e partir do 13º dia foram iniciados os testes comportamentais dos grupos experimentais, como campo aberto (13º dia), em seguida *rotarod* (13º dia) e por último teste rotacional (14º dia), após um período de 24 h os animais foram eutanasiados e removido as áreas cerebrais como hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado ipsilateral e contralateral para as dosagens neuroquímicas de MDA, nitrito e atividade da superóxido dismutase (SOD) (**Figura 6**).

**Figura 6** – Desenho experimental indicando a linha do tempo dos procedimentos experimentais: Cirurgia e testes comportamentais.



Fonte: O autor (2021).

Quanto ao esquema de tratamento, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo eles descritos na tabela 04:

**Tabela 4 - Grupos de tratamento**

Grupo	Dose	Tratamento	Número de animais
1- SHAM	-	SHAM (salina 2 $\mu$ L, intraestriatal) e tratado com veículo (DMSO 2% diluído em salina) v.o	10
2- 6-OHDA + veículo	-	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intraestriatal) tratado com veículo (DMSO 2% diluído em salina) v.o	12
3- 6-OHDA + ESAC	200 mg/Kg	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intraestriatal) tratado com ESAC 200 mg/Kg v.o	14
4- 6-OHDA + L-DOPA	25 mg/Kg	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intraestriatal) tratado com L-DOPA 25 mg/Kg v.o	14

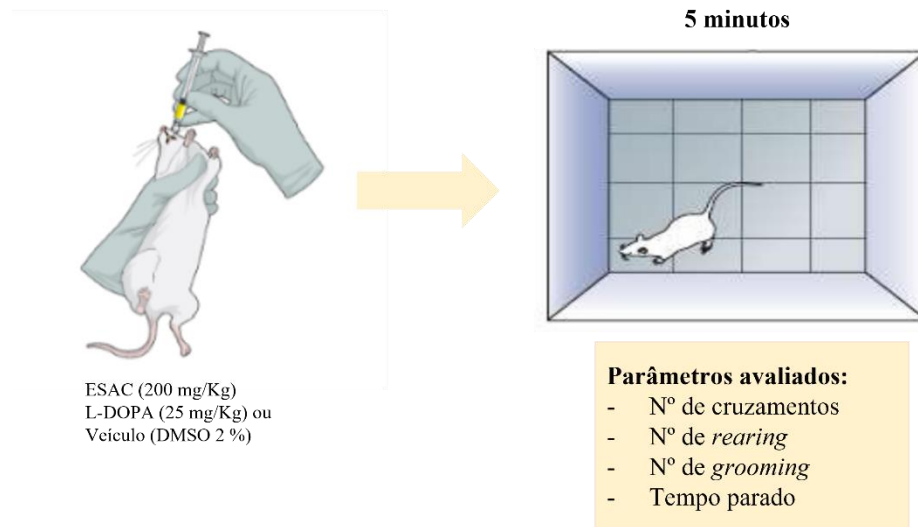
Fonte: O autor (2022).

#### 4.16 Testes comportamentais

##### ➤ Teste do Campo Aberto (Open Field Test)

Este teste foi utilizado na análise locomotora de ratos submetidos ao modelo experimental da doença de Parkinson (HSIAO *et al.*, 2012). Os animais foram inseridos no centro da arena, em um campo aberto, com 60 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura. O teste teve duração de 5 min para cada animal. Foram avaliados a atividade exploratória (distância percorrida no centro e periferia do aparelho (medida de ansiedade), o número total de levantamentos (*rearing*), o número de autolimpeza (*grooming*) e o tempo que os animais permaneceram imóveis. O ambiente tinha isolamento acústico e iluminação vermelha de baixa intensidade. Entre cada teste, o aparelho foi limpo com etanol 10%.

**Figura 7** – Esquema do teste do campo aberto

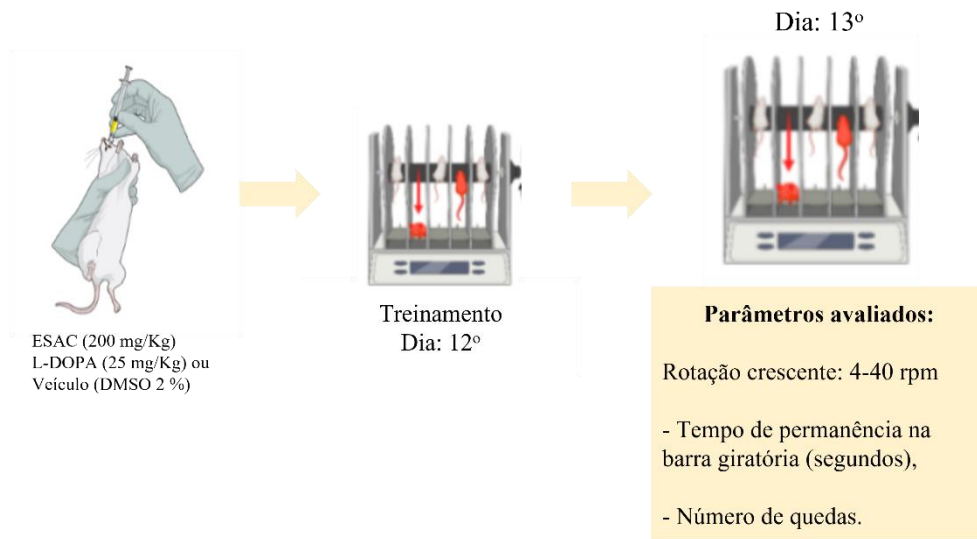


Fonte: O autor (2021).

### ➤ **Teste do rotarod**

O teste do *rotarod* mede a coordenação motora em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). O aparelho utilizado no teste consiste em uma barra circular estriada que girava em torno do seu próprio eixo, com diâmetro de 3 cm, separados em quatro compartimentos com 5 cm de largura e 20 cm de altura a partir de quatro pranchas de inclinação. Os animais foram submetidos ao teste conforme o procedimento descrito por Dunham e Miya (1957) e adaptado por Alves e colaboradores (2011). Foi realizado um treino onde os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 3,5 cm de diâmetro e com uma rotação de 16 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos. Após 24 horas foi realizado o teste, no dia do teste, a rotação tinha uma velocidade crescente de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos. Foram registrados: Tempo de permanência máxima na barra giratória (segundos), e o número de quedas.

**Figura 8** – Esquema do teste do *rotarod*

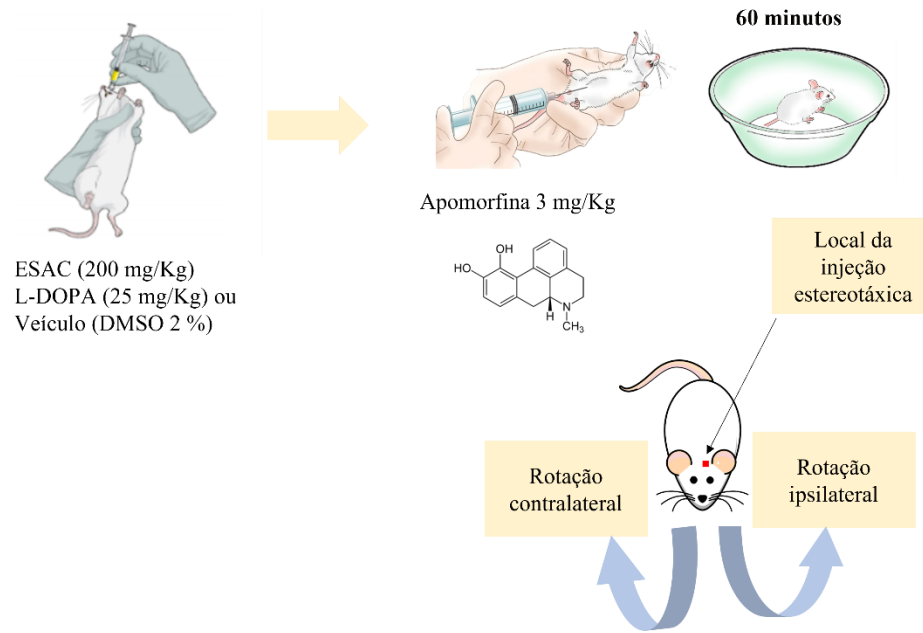


Fonte: O autor (2021).

### ➤ Teste de rotações induzidas por apomorfina

O teste rotacional induzido por apomorfina consiste numa avaliação padrão-ouro para o modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. Dessa forma, para a realização desse ensaio todos os animais foram submetidos ao teste de rotação induzido por apomorfina, no dia 14 após a cirurgia. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas por apomorfina (3 mg/kg.i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão) sendo o número de rotações completas em volta do próprio eixo observada durante 60 minutos (KIM *et al.*, 1998) (**Figura 9**).

**Figura 9** – Esquema do teste rotacional induzido por apomorfina



Fonte: O autor (2021).

#### 4.17 Determinação da concentração de nitrito

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10 mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1982). Para a determinação da concentração de nitrito de acordo com o método de Green *et al.*, (1982) em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). Após a centrifugação (11000 g, 15 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1% / diluído em água (1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placa a 540 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

#### 4.18 Determinação da peroxidação lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o

protocolo a seguir. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) gelado. Sessenta e três microlitros (63  $\mu$ L) do homogenato foram removidos. Posteriormente, 100  $\mu$ L de ácido perclórico (35%) foram adicionados, para interromper a peroxidação, e centrifugados a 14000 g 4°C por 10 minutos. Em seguida, 150  $\mu$ L do sobrenadante foram retirados, e adicionados a 50  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%. A mistura foi levada ao banho maria, por 30 (trinta) minutos, a uma temperatura variável de 95 – 100°C. A solução foi então retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após isso, foi feita a leitura em ELISA (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de MDA por mg de proteína.

#### - Curva-padrão de MDA

A partir da solução padrão de MDA, foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 $\mu$ mol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 535 nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

#### **4.19 Determinação da atividade da superóxido dismutase**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitrotetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina, reduzida fotoquimicamente, gera  $O_2^-$ , o qual reduz o NBT, produzindo formazam, que absorve no comprimento de onda de 560 nm. Na presença de SOD, a redução do NBT é inibida. Para tanto, 80  $\mu$ L do homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (20 minutos, 12.000 rotações por minuto-rpm, 4°C). Para o ensaio, foi utilizado o sobrenadante. Numa câmara escura, foram misturados 1 mL do meio de reação (tampão fosfato 50 mM, EDTA 100 nM e L-metionina 13 mM pH 7,8), 150  $\mu$ L do NBT 75  $\mu$ M, 300  $\mu$ L riboflavina 5  $\mu$ M e 50  $\mu$ L da amostra ou do tampão utilizado para o preparo dos homogenatos. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15 W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50% (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

#### **4.20 Avaliação Bioquímica do sangue**

Os animais (n= 6) dos diferentes grupos foram anestesiados com a combinação de xilazina (10 mg/Kg, i.p.) e ketamina (100 mg/Kg, i.p.), para a obtenção das amostras de sangue periférico por meio do plexo orbital, coletados no tubo de coleta contendo heparina sódica 50 U/mL para realização dos testes bioquímicos. A Aliquota do sangue coletado foi processada

para a separação do plasma para as análises bioquímicas e de eletrólitos em Analisador Bioquímico Automático Labmax pleno, modelo standard (Labtest, Brasil). Visando avaliar a função renal dos animais mediante observação dos valores da (ureia e creatina), a função hepática (transaminase oxalacética - TGO e transaminase pirúvica - TGP), e quanto o metabolismo glicosídico (glicemia), perfil lipídico (colesterol total) e ainda alterações nos eletrólitos (cálcio, magnésio, fósforo, sódio e potássio), nos diferentes grupos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA. Os exames foram realizados seguindo os protocolos do fabricante do equipamento e dos kits reagentes para cada parâmetro avaliado.

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

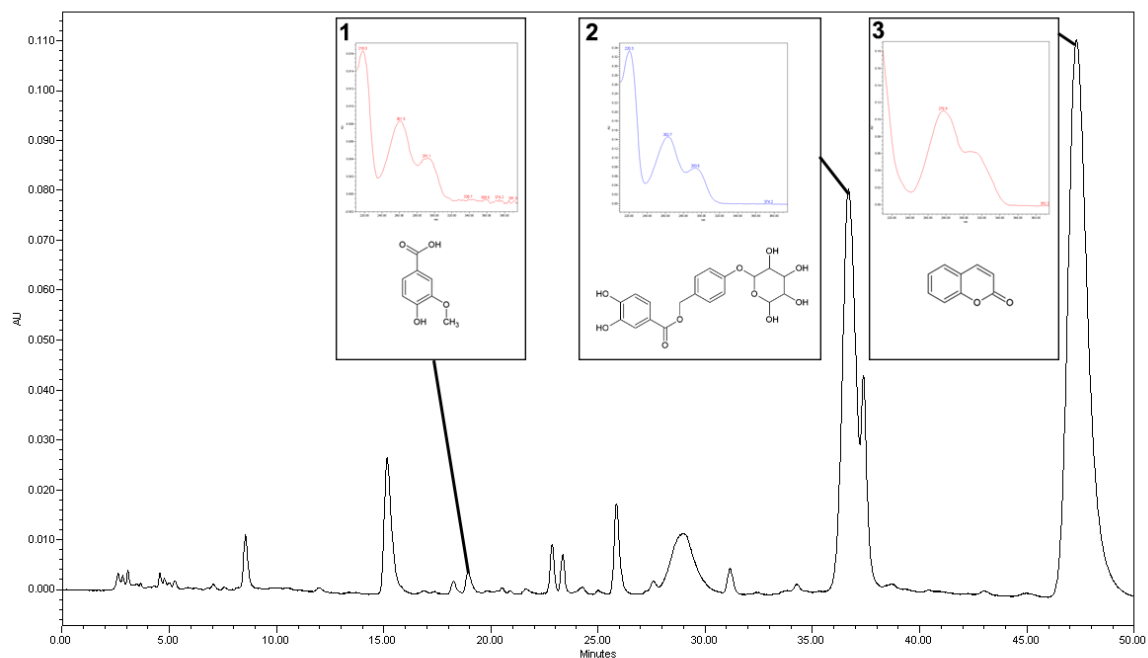
As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.) e todos os resultados expressos em  $\pm$  EPM (erro padrão da média). As diferenças foram avaliadas por ANOVA de uma via ou de duas vias, seguidas de teste post hoc de Bonferroni quando adequado, por one-sample t test ou two-sample t test e para dados não paramétricos usou-se Mann-Whitney. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5- RESULTADOS

### 6.1 ESAC padronizado e constituintes químicos (CM, AV e AMB)

Extrato seco de *A. cearensis* (ESAC) foi caracterizado por HPLC-PDA como mostrado na **figura 10**. A análise de HPLC permitiu detectar e quantificar três moléculas (mg/g de extrato seco): ácido vanílico =  $2,7 \pm 0,01$  mg/g; amburosídeo A =  $30,4 \pm 0,01$  mg/g e cumarina =  $70,07 \pm 0,01$  mg/g.

**Figura 10** – Perfil cromatográfico do extrato seco de *Amburana cearensis* (ESAC)



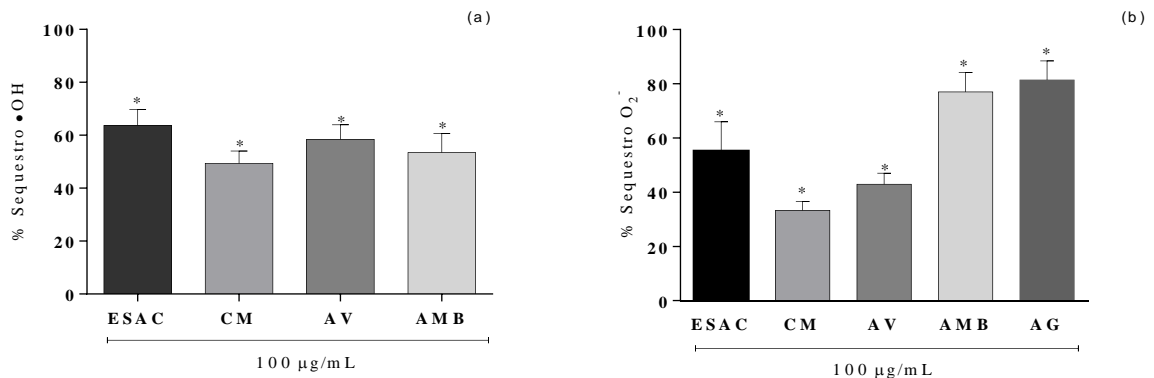
Fonte: O autor. **Legenda:** Perfil cromatográfico do extrato seco de *A. cearensis* (ESAC) e identificação de três compostos (1) ácido vanílico, (2) Amburosídeo A e (3) cumarina.



## 6.2 ESAC, AMB, CM e AV possuem atividade sequestradora de radicais livres: radical hidroxila e ânion superóxido

A quantidade excessiva de oxidantes produzida por células microgлияis ativadas pode levar a danos celulares e apoptose. Investigamos a possível atividade sequestradora de radicais livres de oxigênio do ESAC e seus princípios ativos. No presente estudo, ESAC, CM, AV e AMB (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) apresentaram atividade sequestradora dos radicais ânion superóxido e radical hidroxila (**Figura 11**). A atividade de eliminação de ânion superóxido do AMB (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi de  $77,0 \pm 12,3\%$ , um efeito comparável ao ácido gálico usado como antioxidante ( $81,4 \pm 7,1\%$ ). Em relação ao ESAC, CM e AV exibiram atividade sequestradora de  $55,2 \pm 10,8\%$ ,  $33,3 \pm 3,3\%$  e  $43,0 \pm 4,0\%$ , respectivamente do radical ânion superóxido. O efeito sequestrador de ESAC e seus princípios ativos sobre o radical hidroxila ocorreu com a seguinte ordem de grandeza  $\text{ESAC} > \text{AV} > \text{AMB} > \text{CM}$ .

**Figura 11** – Atividade sequestradora do ESAC, CM, AV ou AMB frente aos radicais livres (radical hidroxila e ânion superóxido)

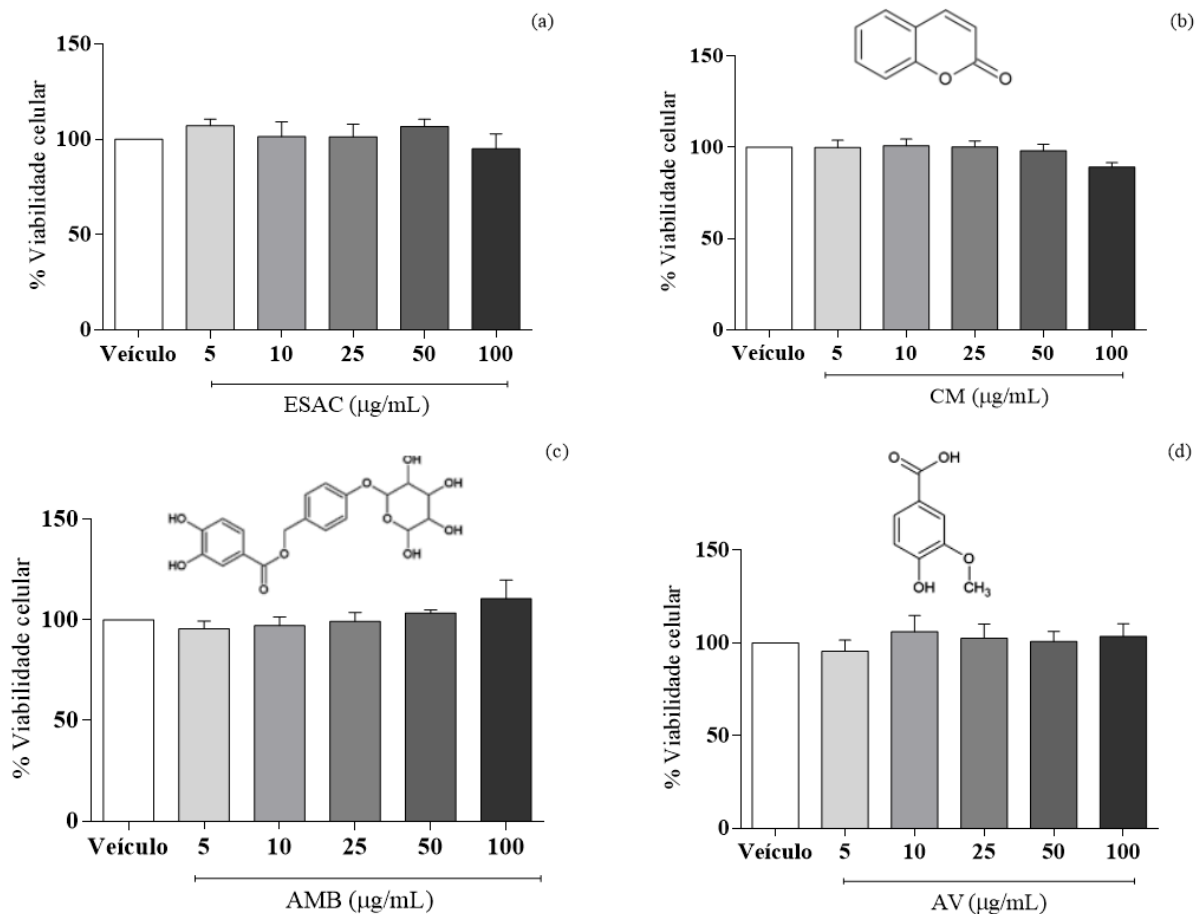


Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeito de sequestro do radical hidroxila (A) e ânion superóxido (B) pelo ESAC e seus ativos cumarina (CM), ácido vanílico (AV) e amburosídio A (AMB). Foi usado one-sample t test, \* vs 100%.

### 6.3 ESAC padronizado e constituintes químicos não são tóxicos para células microgлияis (linhagem BV-2).

Na **figura 12a** pode ser observado que o pré-tratamento das células com ESAC (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) não afetou significativamente a viabilidade das células ( $99,8 \pm 4,1\%$ ;  $100,8 \pm 3,7\%$ ;  $100,2 \pm 3,2\%$ ;  $98,0 \pm 3,7\%$ ;  $89,2 \pm 2,4\%$ , respectivamente), quando comparado ao veículo/grupo controle (100% viabilidade). Observamos também, que o pré-tratamento com CM (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) não afetou significativamente a viabilidade das células ( $99,8 \pm 41,1\%$ ;  $100,8 \pm 3,7\%$ ;  $100 \pm 3,2\%$ ;  $98,0 \pm 3,7\%$ ;  $89,2 \pm 2,4\%$ , respectivamente) (**Figura 12b**), quando comparado ao veículo/grupo controle (100% viabilidade). De forma semelhante, foi observado que o pré-tratamento das células com AMB (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) não afetou significativamente a viabilidade das células ( $95,7 \pm 3,7\%$ ;  $97,2 \pm 4,2\%$ ;  $99,0 \pm 4,3\%$ ;  $103,0 \pm 1,7\%$ ;  $110,6 \pm 9,3\%$ , respectivamente) (**Figura 12c**), quando comparado ao veículo/grupo controle (100% viabilidade). Por fim, o pré-tratamento das células com AV (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) não afetou significativamente a viabilidade das células ( $95,6 \pm 5,9\%$ ;  $106,0 \pm 8,7\%$ ;  $102,6 \pm 7,6\%$ ;  $100,8 \pm 5,4\%$ ;  $103,6 \pm 6,8\%$ , respectivamente) (**Figura 12c**), quando comparado ao veículo/grupo controle (100% viabilidade).

**Figura 12** - Efeito de ESAC e constituintes químicos (CM, AMB e AV) na viabilidade celular de BV-2 determinado através do teste MTT.



Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeito do ESAC (a), CM (b), AMB (c) ou AV (d) (5-100  $\mu\text{g/mL}$ ) na viabilidade de células BV-2 medida através do ensaio do MTT. Dados mostrados como porcentagem do controle (veículo; 0,1% DMSO). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni,  $n = 4/\text{grupo}$ .

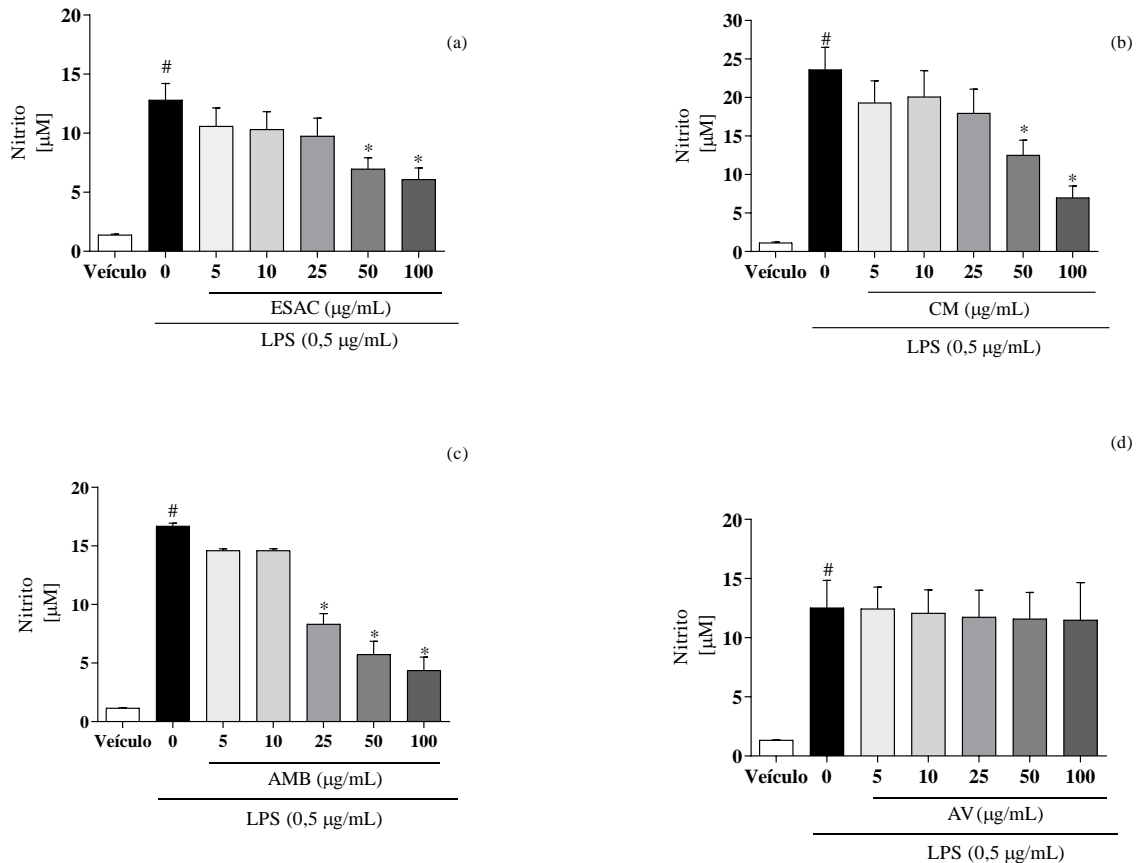
#### 6.4 ESAC e ativos (CM e AMB) reduzem a produção de NO em células microgliais estimuladas por LPS.

A micróglia desempenha um papel central na neuroinflamação sendo responsável pela síntese e liberação de uma ampla gama de mediadores químicos incluindo citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, EROs e NO. Primeiro foi investigado o efeito de ESAC e seus princípios ativos (AMB, CM e AV) na produção de nitrito, que equivale à produção de NO de células microgliais induzida por LPS. A adição de ESAC ou seus constituintes químicos em concentrações crescentes não alterou os níveis basais de NO em células BV-2 (dado não mostrado). O LPS aumentou a liberação de nitrito (Nitrito:  $13,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) em células microgliais, quando comparado ao grupo não tratado (veículo/grupo controle) (Nitrito:  $1,4 \pm 0,08 \mu\text{M}$ ). Este efeito foi significativamente reduzido (Nitrito:  $6,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ,  $6,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ) pelo pré-tratamento de células com ESAC nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Concentrações menores do ESAC (5, 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram capazes de reduzir a concentração de nitrito (Nitrito:  $10,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ,  $10,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ;  $9,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ), quando comparado com o grupo LPS (Nitrito:  $13,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) (**Figura 13a**).

Foi observado novamente que o LPS aumentou a liberação de nitrito (Nitrito:  $23,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ) em células microgliais quando comparado ao grupo não tratado (veículo/grupo controle) (Nitrito:  $1,1 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ). Este efeito foi significativamente reduzido (Nitrito:  $12,5 \pm 3,1 \mu\text{M}$ ,  $6,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ) pelo pré-tratamento de células com CM nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Concentrações menores de CM (5, 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram capazes de reduzir a concentração de nitrito (Nitrito:  $19,3 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ,  $20,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$ ,  $18 \pm 3,1 \mu\text{M}$ ) quando comparado com o grupo LPS (Nitrito:  $23,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ) (**Figura 13b**). De forma semelhante demonstrada nos dados anteriores o LPS aumentou a liberação de nitrito ( $16,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) em células microgliais quando comparado ao grupo não tratado (veículo/grupo controle) (Nitrito:  $1,2 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ). No entanto, o grupo pré-tratado com AMB apresentou redução significativa na produção de nitrito a partir da concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparados com o grupo LPS (Nitrito:  $8,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ). Essa redução significativa (Nitrito:  $5,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ,  $4,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ) também foi observada nas maiores concentrações de AMB (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), quando comparado com o grupo LPS (Nitrito:  $18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ). Concentrações menores do AMB (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) não foram capazes de reduzir a concentração de nitrito (Nitrito:  $14,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ,  $14,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) quando comparado com o grupo LPS (Nitrito:  $16,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) (**Figura 13c**). O pré-tratamento das células com AV não interferiu significativamente na produção de nitrito

induzida por LPS (**Figura 13d**).

**Figura 13** – Efeito de ESAC, CM, AMB e AV na produção de nitrito induzida por LPS em células da linhagem BV-2.

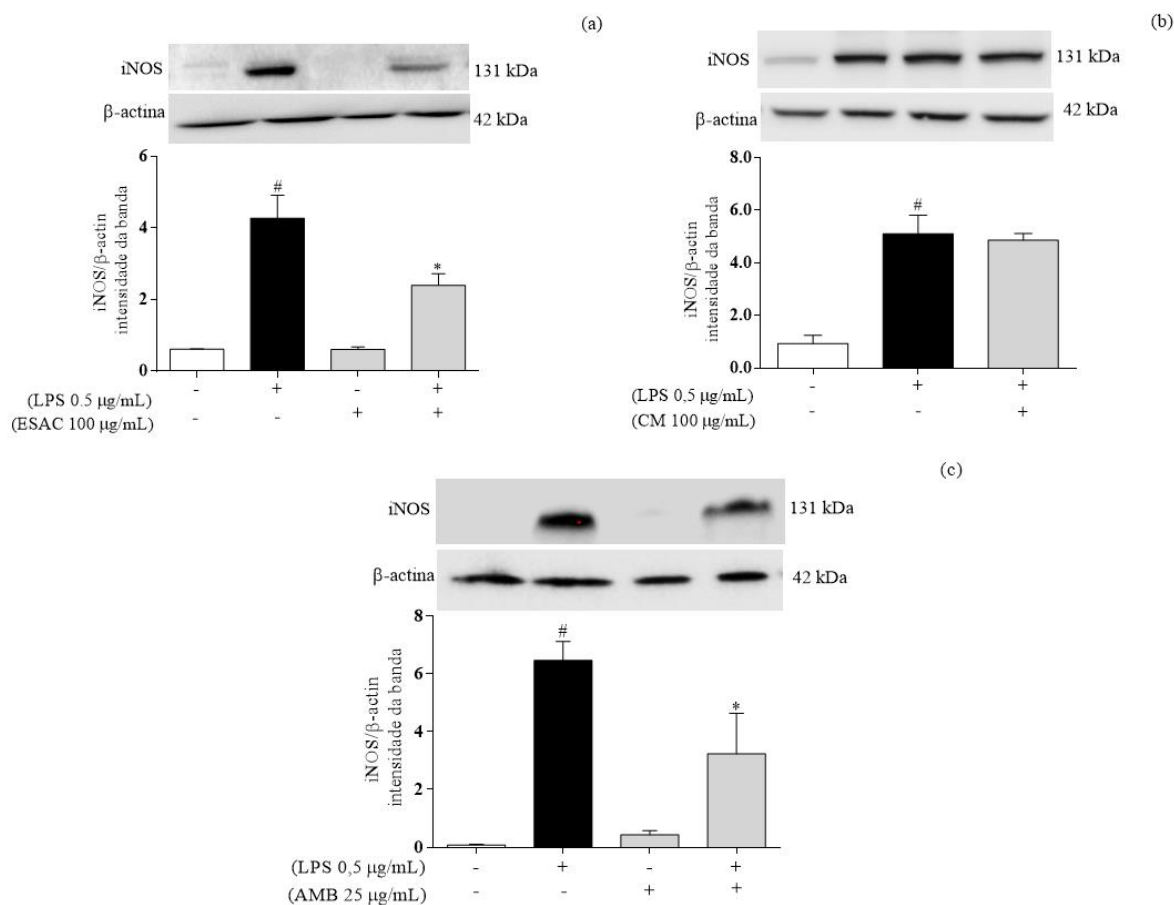


Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeito de ESAC (a), CM (b), AMB (c) e AV (d) (5-100 µg/mL) na produção de nitrito induzida por LPS. As células BV-2 foram pré-tratadas com as drogas por 1 h e incubadas com ou sem LPS (0,5 µg/mL) por 24 h. Todos os valores são expressos como média ± EPM da concentração e de nitrito. *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. # vs veículo/grupo controle (DMSO 0,1%) ( $p < 0,05$ ); \* $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

### **6.5 ESAC e AMB reduzem a expressão de iNOS induzida por LPS em células da linhagem BV-2.**

Considerando os resultados obtidos no ensaio de Griess, escolhemos a concentração capaz de inibir a partir de 50% a liberação de nitrito para cada droga (ESAC, AMB e CM) para avaliar se a supressão da produção de nitrito por ESAC, AMB ou CM estava relacionada à expressão de sua sintase correspondente, iNOS. O LPS induziu um aumento significativo na densidade de iNOS (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $4,2 \pm 0,06$  e  $6,5 \pm 0,08$ , respectivamente) quando comparado ao grupo controle negativo (DMSO 0,1%) (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $0,6 \pm 0,01$  e  $0,08 \pm 0,01$ , respectivamente) e esse efeito foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento com ESAC (100  $\mu\text{g/mL}$ ) e AMB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $2,4 \pm 0,06$  e  $3,2 \pm 0,4$ , respectivamente), quando comparamos com o grupo LPS (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $4,2 \pm 0,06$  e  $6,5 \pm 0,08$ , respectivamente) (**Figura 14**). Por outro lado, o tratamento de células BV-2 com CM não teve efeito na expressão de iNOS. Na ausência de LPS, ESAC e seus princípios ativos não alteraram a expressão de iNOS.

**Figura 14** – Efeitos do ESAC, CM, AMB na expressão de iNOS em células BV-2 estimuladas por LPS.



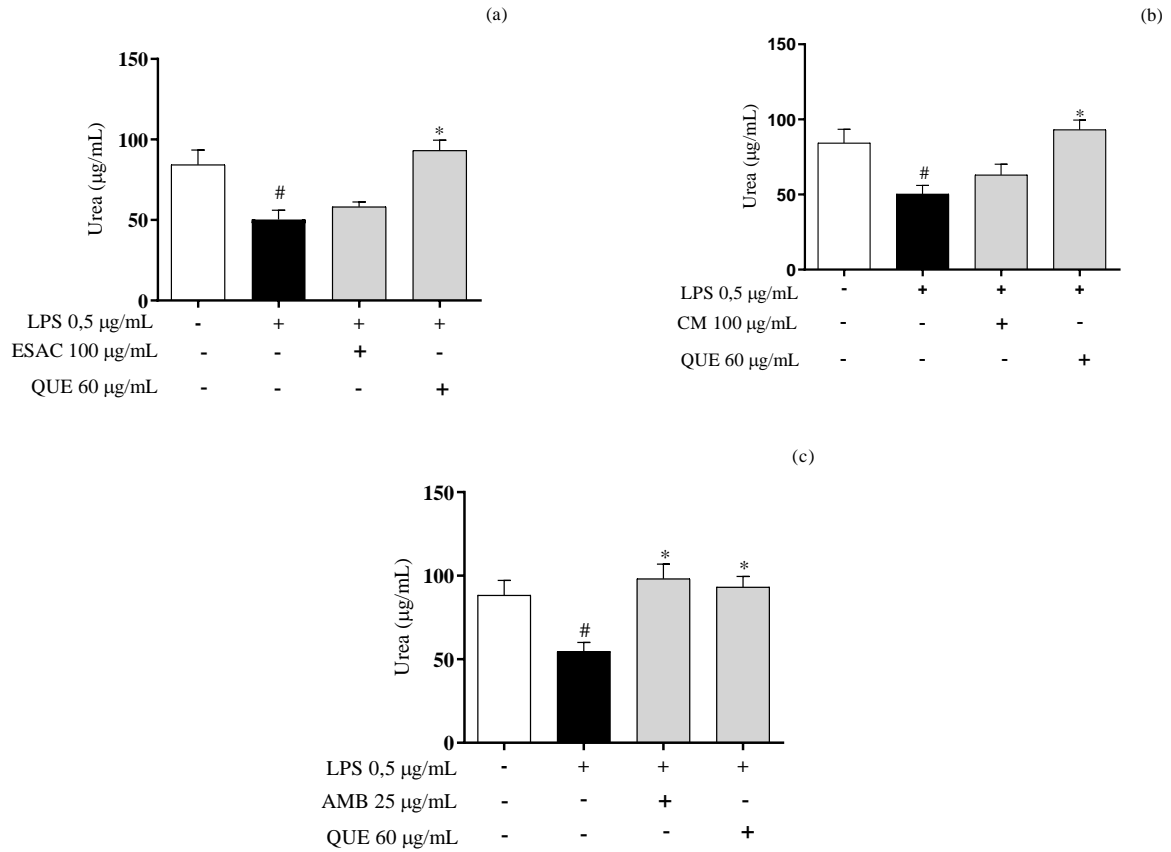
Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos de ESAC (a), CM (b) e AMB (c) na expressão de iNOS em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL), CM (100 µg/mL) ou AMB (25 µg/mL) por 1 h e incubadas com LPS (0,5 µg/mL) por mais 24 h. *One-way* ANOVA no gráfico b, e *Two-way* ANOVA para os gráficos a e c, seguido de pós-teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga), \*  $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

## **6.6 AMB impede a redução da atividade da arginase induzida por LPS em células linhagem BV-2.**

A adição de LPS (0,5 µg/mL) às células BV-2 reduziu significativamente a atividade da arginase, medida pela concentração de ureia (Ureia:  $50,3 \pm 5,7$  µg/mL) quando comparada ao grupo não tratado (Ureia:  $88,5 \pm 8,7$  µg/mL). Nosso estudo mostrou que o AMB impediu a redução da atividade da arginase (Ureia:  $98,1 \pm 8,8$  µg/mL) quando comparado ao grupo LPS (Ureia:  $50,3 \pm 5,7$  µg/mL) (0,5 µg/mL), efeito comparável com o grupo quercetina (droga de referência) (Ureia:  $93,2 \pm 6,5$  µg/mL), ESAC e CM não apresentaram efeito significativo, embora ESAC (100 µg/mL:  $58,2 \pm 3,0$  µg/mL) e CM (100 µg/mL  $63,1 \pm 7,1$  µg/mL) tenham apresentado aumento da atividade da arginase em cerca de 15,4% e 25,2%, respectivamente, **(Figura 15)**.



**Figura 15** – Efeitos do ESAC, CM e AMB na atividade da arginase em células BV-2 estimuladas por LPS.



Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos do ESAC (a), CM (b) e AMB (c) na atividade da arginase em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL), CM (100 µg/mL) ou AMB (25 µg/mL) por 1 h e incubadas com LPS (0,5 µg/mL) por mais 24 h. One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. # p < 0,05 vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga), \*p < 0,01 vs grupo LPS, n = 4/grupo.

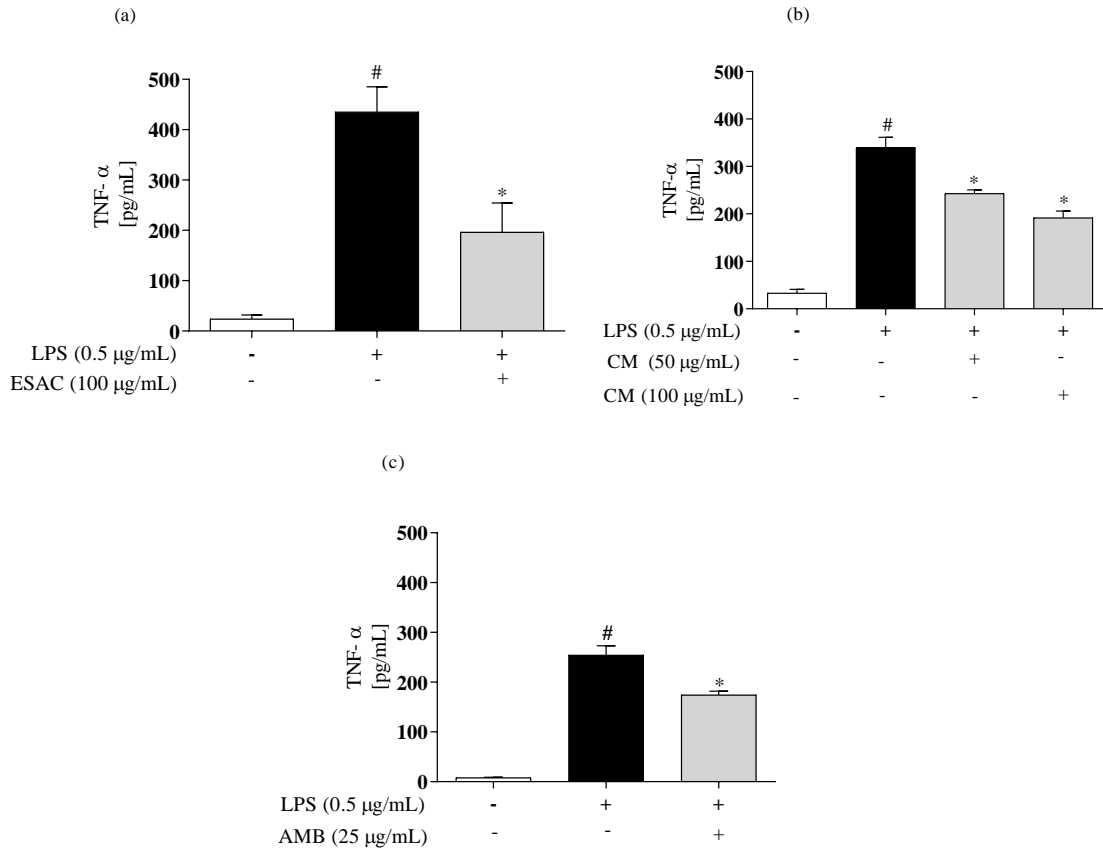
### 6.7 ESAC, AMB e CM regulam a produção de citocinas em células microgлияis (linhagem BV-2) estimuladas por LPS

A adição de LPS por 24 h induziu aumento significativo de aproximadamente 93% nos níveis de TNF- $\alpha$ , quando comparamos com o controle negativo (grupo sem estímulo). O pré-tratamento com ESAC (100  $\mu\text{g/mL}$ ), CM (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou AMB (25  $\mu\text{g/mL}$ ) (TNF- $\alpha$ : 196,4  $\pm$  58,0 pg/mL, 191,7  $\pm$  14,5 pg/mL e 174,4  $\pm$  7,6 pg/mL, respectivamente), reduziram de forma significativa esse aumento, quando relacionado ao grupo LPS (TNF- $\alpha$ : 435,1  $\pm$  50,2 pg/mL, 339,8  $\pm$  21,6 pg/mL e 254,5  $\pm$  18,5 pg/mL, respectivamente) (**Figura 16**).

Nosso resultado mostrou que a adição de LPS por 24 h induziu um aumento significativo de aproximadamente 95% nos níveis de IL-6, quando comparamos com o controle negativo (grupo sem estímulo). O pré-tratamento com ESAC, CM ou AMB (IL-6: 82,0  $\pm$  7,7 pg/mL, 231,0  $\pm$  18,2 pg/mL e 199,0  $\pm$  7,3 pg/mL, respectivamente), reduziram de forma significativa esse aumento, quando relacionado ao grupo LPS (IL-6: 242,2  $\pm$  23,7 pg/mL, 301,7  $\pm$  21,0 pg/mL e 320,1  $\pm$  55,04 pg/mL, respectivamente) (**Figura 17**).

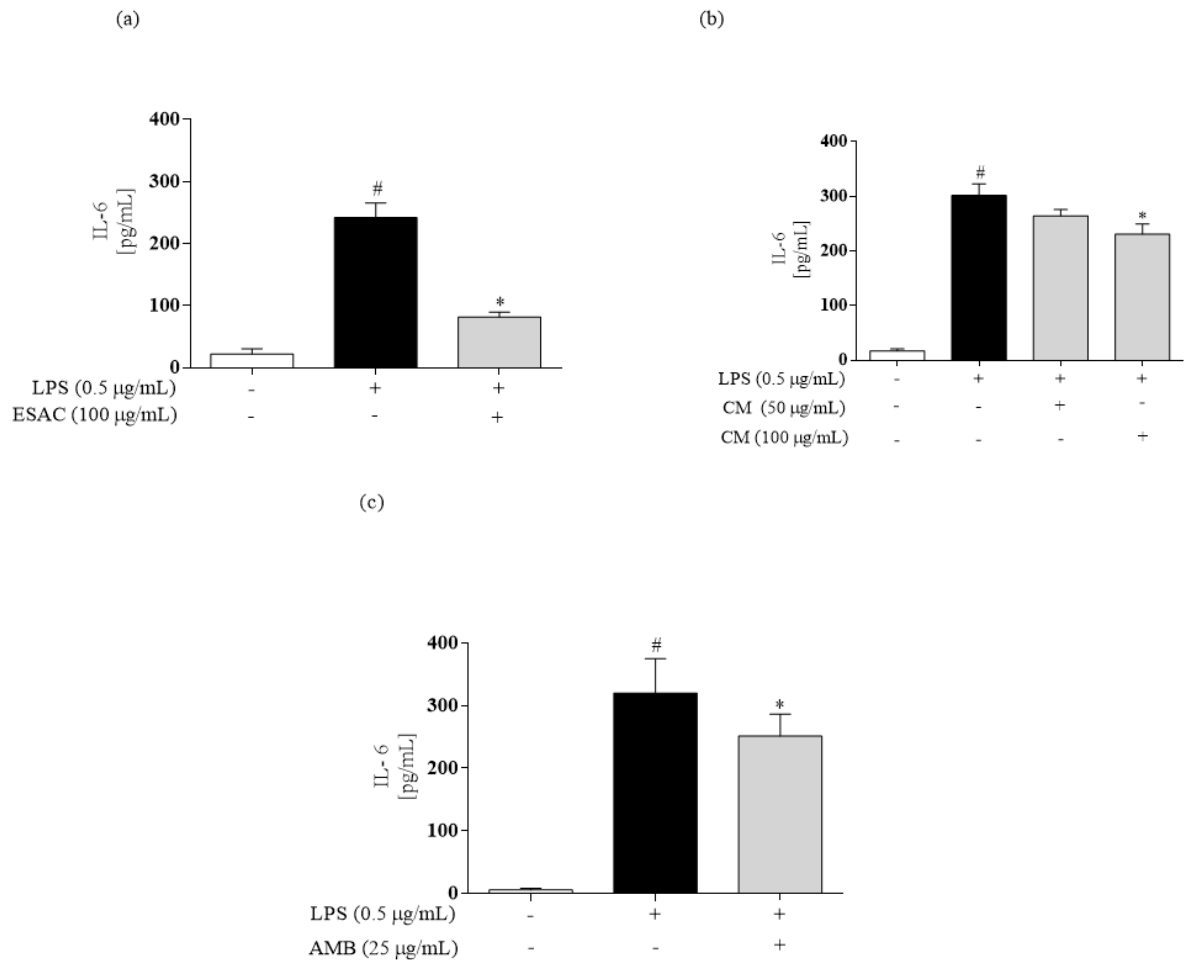
Na avaliação da possível atividade imunomoduladora exercida pelo ESAC e ativos (CM e AMB) sobre a produção de citocinas anti-inflamatórias, a **figura 18**, apresenta o efeito do extrato e moléculas na produção de IL-10. A adição de LPS por 24 h diminuiu de forma significativa IL-10, quando comparamos com o controle negativo (grupo sem estímulo). Por outro lado, a redução de IL-10 induzida por LPS em células BV-2 não foi significativamente afetada pelas drogas testadas, embora ESAC e AMB tenham aumentado sua concentração em aproximadamente 20,6% e 62,7%, respectivamente, em relação ao grupo LPS.

**Figura 16** – Efeito do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de TNF- $\alpha$  em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS.



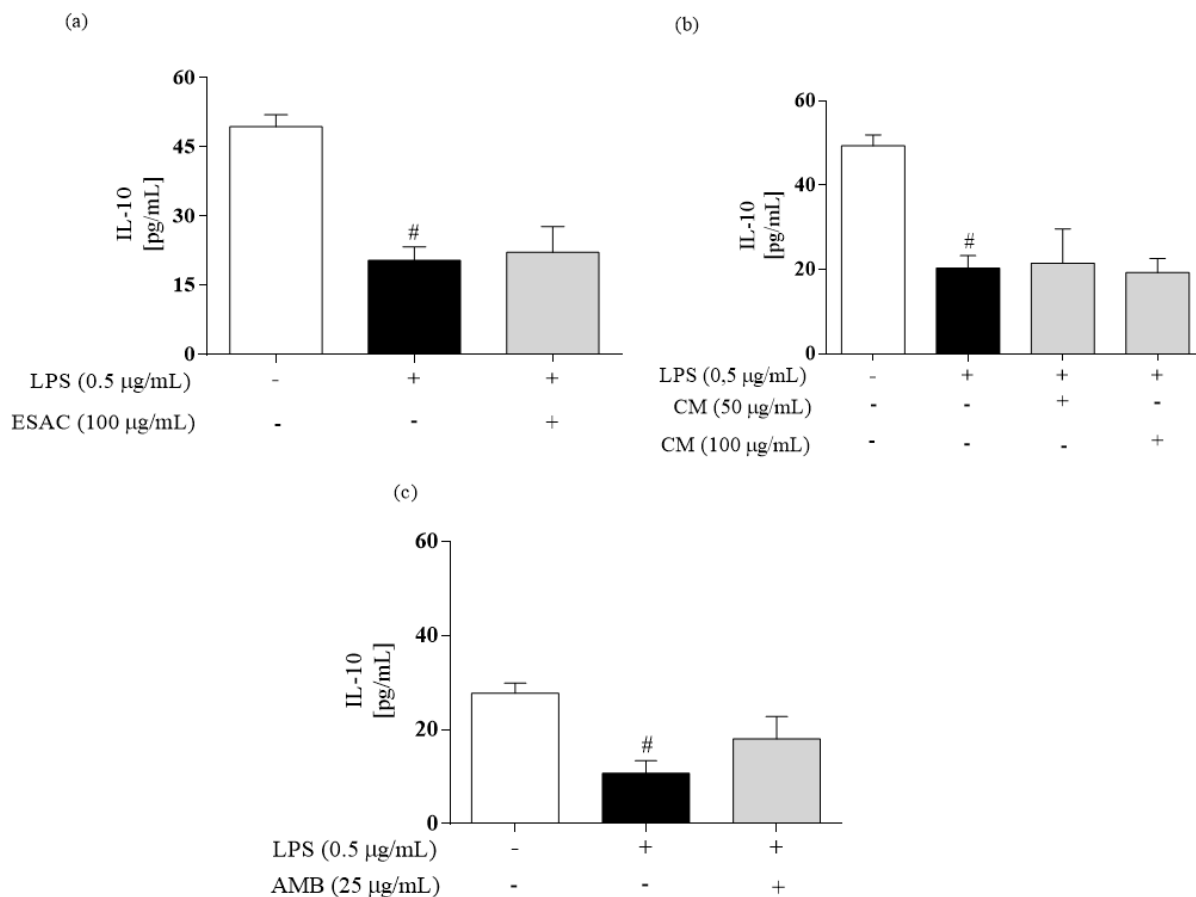
Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos de ESAC, CM e AMB na liberação de TNF- $\alpha$  em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL), CM (50, 100 µg/mL) ou AMB (25 µg/mL) por 1 h e ativadas com LPS (0,5 µg/mL) por mais 24 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga); \*  $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

**Figura 17** – Efeitos do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de IL-6 em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS.



Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos de ESAC, CM e AMB na liberação de IL-6 em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL), CM (50, 100 µg/mL) ou AMB (25 µg/mL) por 1 h e ativadas com LPS (0,5 µg/mL) por mais 24 h. Os resultados são expressos como média ± EPM. *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga); \*  $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

**Figura 18** – Efeito do ESAC, CM e AMB na regulação da produção de IL-10 em células linhagem BV-2 estimuladas por LPS.

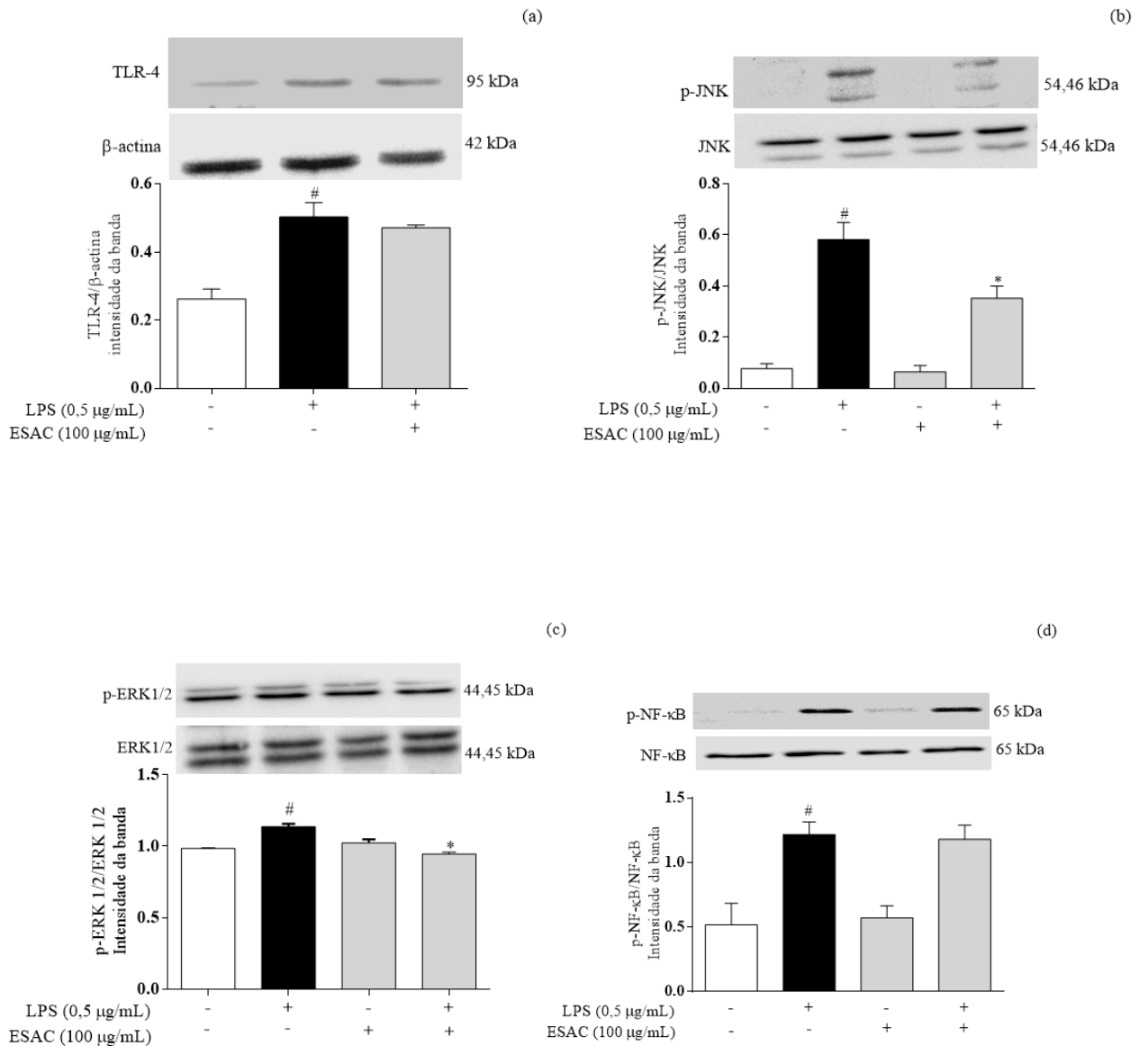


Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos de ESAC, CM e AMB na liberação de IL-10 em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL), CM (50, 100 µg/mL) ou AMB (25 µg/mL) por 1 h e ativadas com LPS (0,5 µg/mL) por mais 24 h. Os resultados são expressos como média ± EPM. *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga); \*  $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

### 6.8 ESAC diminui a fosforilação da via das MAPKs (ERK1/2 e JNK) induzidas por LPS em células da linhagem BV-2.

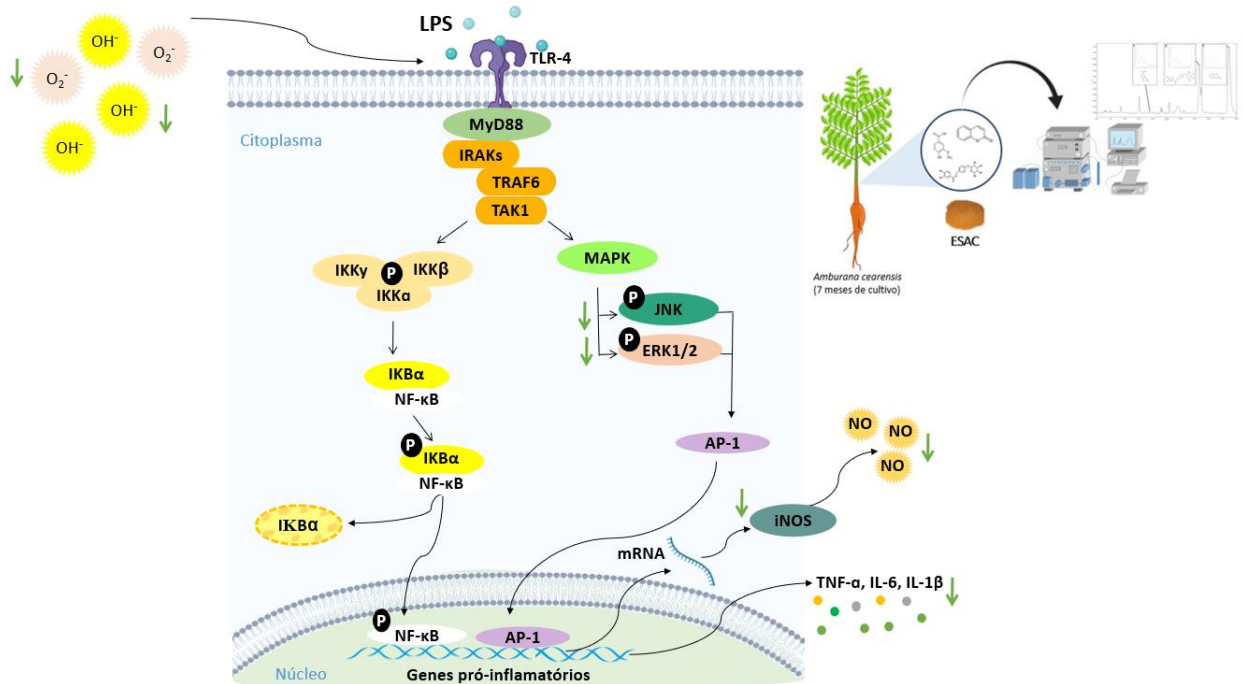
A partir desse ensaio passaremos a investigar o efeito apenas do ESAC (ativos CM, AV e AMB), devido ao potencial efeito anti-inflamatório ao diminuir a produção de mediadores inflamatórios (NO, TNF- $\alpha$  e IL-6) em células microgliciais BV-2 ativadas por LPS. O LPS induz uma resposta inflamatória através da ligação e ativação do receptor TLR-4. Primeiramente investigamos o efeito do ESAC na expressão desse receptor em células BV-2, seguido pela análise da fosforilação de suas proteínas de sinalização (NF- $\kappa$ B e MAPKs). Os resultados do *Western blotting* mostraram que a exposição ao LPS (0,5  $\mu$ g/mL) aumentou significativamente a expressão de TLR-4 (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:  $0,5 \pm 0,04$ ) em células BV-2 quando comparado ao grupo controle (grupo não tratado) (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:  $0,2 \pm 0,03$ ). No entanto, o pré-tratamento com ESAC não impediu significativamente esse aumento (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:  $0,5 \pm 0,008$ ) (**Figura 19a**). Conforme mostrado nas **figuras 19b e 19c**, a estimulação com LPS resultou na fosforilação de ERK1/2 e JNK (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $0,6 \pm 0,06$ ; intensidade da banda p-ERK1/2/ERK1/2 total:  $1,1 \pm 0,02$ ), e o pré-tratamento com ESAC diminuiu significativamente a fosforilação de ambas as MAPKs (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $0,4 \pm 0,04$ ; intensidade da banda p-ERK1/2/ERK1/2 total:  $0,9 \pm 0,01$ ). A fosforilação do NF- $\kappa$ B p65 não foi alterada pelo ESAC (**Figura 19d**). Na **figura 20** estão representadas as vias de sinalização ativada após exposição de células microgliciais (linhagem BV-2) ao LPS, demonstrando o efeito de ESAC sobre a expressão dessas vias e sobre a produção de mediadores inflamatórios.

**Figura 19** – Efeitos do ESAC nas vias TLR-4/NF- $\kappa$ B/ERK1/2 e JNK induzidas por LPS.



Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos de ESAC na expressão de TLR-4, p-NF- $\kappa$ B p65, p-JNK e p-ERK1/2 em células BV-2 estimuladas por LPS. As células foram pré-tratadas com ESAC (100  $\mu$ g/mL) por 1 h e incubadas com LPS (0,5  $\mu$ g/mL) por mais 1 hora. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. *One-way* para o gráfico a e *Two-way* ANOVA para os gráficos b, c e d), seguido de pós-teste de Bonferroni. <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs controle negativo (0,1% DMSO, veículo da droga), <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs grupo LPS,  $n = 4$ /grupo.

**Figura 20** – Mecanismo de ação do ESAC sobre as vias de sinalização (NF- $\kappa$ B e MAPKs) e produção de mediadores inflamatórios induzidas pela ativação com LPS em células microgliais da linhagem BV-2.



**Fonte:** DE ARAÚJO *et al.*, 2022, com modificações. **Legenda:** Mecanismo de sinalização para os efeitos do ESAC (ativos- CM, AMB e AV) na neuroinflamação induzida por LPS em células BV-2. A ativação do receptor toll-like 4 (TLR-4) por LPS leva à ativação das vias NF- $\kappa$ B p65 e MAPK. O complexo IKK fosforila I $\kappa$ B $\alpha$ , o que leva à degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  e subsequente translocação nuclear de NF- $\kappa$ B p65. Ao mesmo tempo, a via MAPK (JNK e ERK1/2) regula a transcrição de mediadores inflamatórios através da ativação do fator de transcrição AP-1. A ativação de NF- $\kappa$ B p65 e AP-1 resulta na expressão de iNOS e na produção de mediadores pró-inflamatórios. O ESAC interrompe as vias neuroinflamatórias induzidas por LPS, diminuindo a sinalização de JNK e ERK1/2. ESAC e constituintes químicos diminuem a expressão de iNOS, bem como a produção de mediadores inflamatórios (NO e citocinas). Paralelo a isso, ESAC tem atividade sequestradora ao diminuir a produção dos oxidantes (O $_2^{\cdot-}$  e OH $^{\cdot}$ ). As setas verdes indicam diminuição da liberação de mediadores inflamatórios e da expressão de vias de sinalização. Legenda: IKK: complexo de quinase I $\kappa$ B; I $\kappa$ B $\alpha$ : inibidor de capa B; P: Fosfato; NF- $\kappa$ B: Fator kapa nuclear B; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; ERK: quinase reguladora de sinal extracelular; AP-1: proteína ativadora 1.



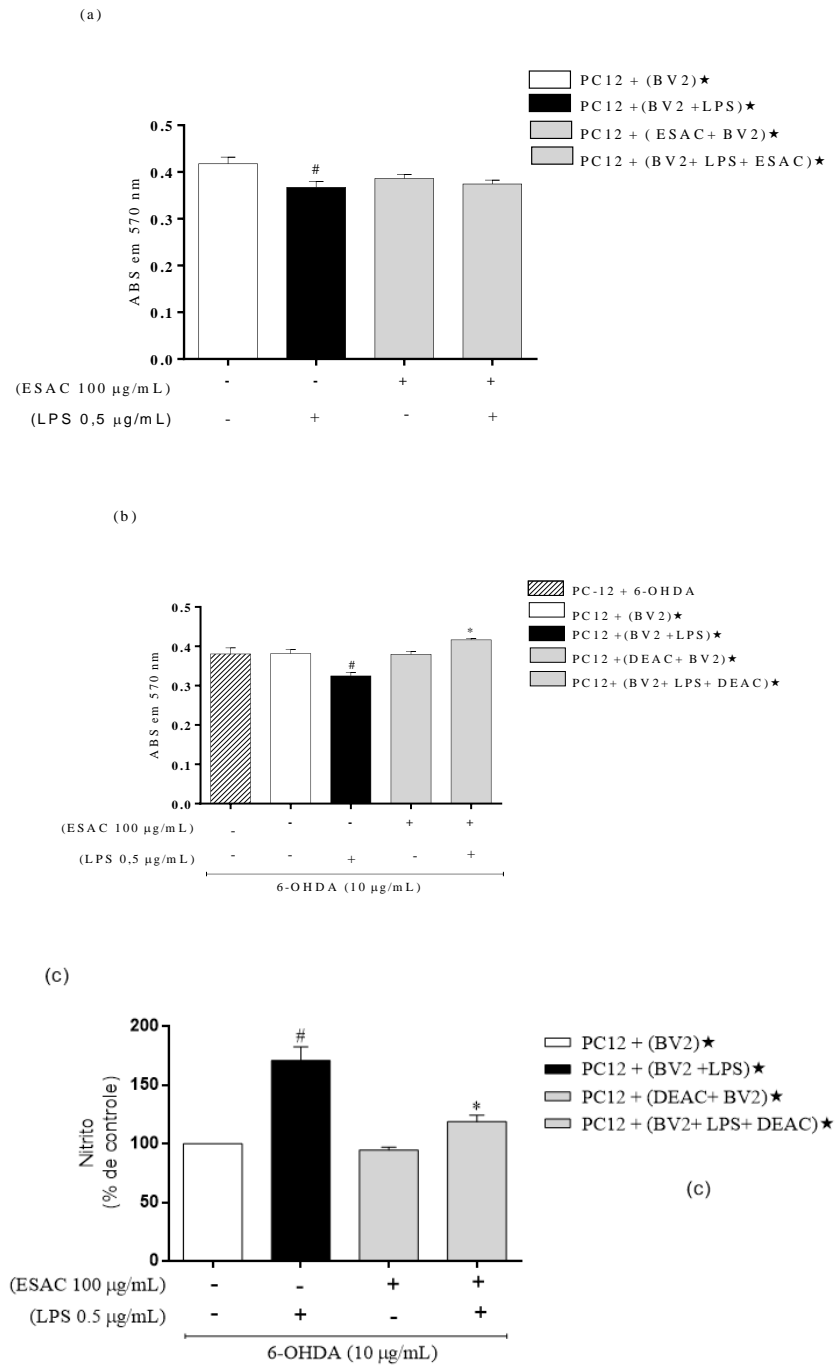
### 6.9 ESAC apresenta efeito antineuroinflamatório em células da linhagem PC-12 expostas à 6-OHDA e ao meio condicionado de células da linhagem BV-2 estimuladas por LPS.

Para avaliar uma condição neurodegenerativa *in vitro* foi realizado testes preliminares simulando a interação entre células neuronais (linhagem PC-12) e mediadores inflamatórios liberados por micróglia ativas (linhagem BV-2). Após exposição das células PC-12 ao meio condicionado de células BV-2 ativas por LPS, foi observada diminuição da viabilidade celular (absorbância:  $0,37 \pm 0,01$ ), que correspondeu 12% de redução em comparação com meio condicionado de células BV-2 não ativas (absorbância:  $0,42 \pm 0,01$ ). A adição de ESAC (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ao meio da BV-2 ativada (absorbância:  $0,38 \pm 0,01$ ) não reverteu o efeito do LPS nas células da linhagem PC-12.

As células PC-12 em meio condicionado, oriundo da exposição de células microgliciais ao LPS, e na presença de 6-OHDA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tiveram maior redução da viabilidade celular (LPS + 6-OHDA) (absorbância:  $0,32 \pm 0,01$ ) (**Figura 21b**) em relação ao grupo sem 6-OHDA (**Figura 21a**) (absorbância:  $0,37 \pm 0,01$ ). O ESAC não interferiu na viabilidade celular (absorbância:  $0,38 \pm 0,01$ ), e na presença da 6-OHDA em meio condicionado (BV-2 + LPS) restaurou a viabilidade celular (absorbância:  $0,42 \pm 0,04$ ) em relação ao grupo 6-OHDA + (BV-2 + LPS) (absorbância:  $0,32 \pm 0,01$ ) (**Figura 21b**).

A adição de 6-OHDA (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em células PC-12 mantidas em meio condicionado (BV-2 + LPS) aumentou a concentração de nitrito (Nitrito:  $171,1 \pm 11,6$ ) em relação ao grupo mantido em meio condicionado (BV-2) (Nitrito:  $100 \pm 0,00$ ). Porém, o ESAC reduziu (Nitrito:  $118,9 \pm 5,4$ ) esse efeito, alcançando concentração de nitrito comparável ao grupo tratado com meio condicionado (BV-2) (Nitrito:  $100 \pm 0,00$ ) (**Figura 21c**).

**Figura 21** – Efeitos do ESAC na neurotoxicidade de células da linhagem PC-12 expostas à 6-OHDA e induzidas por meio condicionado a partir de células linhagem BV-2 ativadas por LPS.



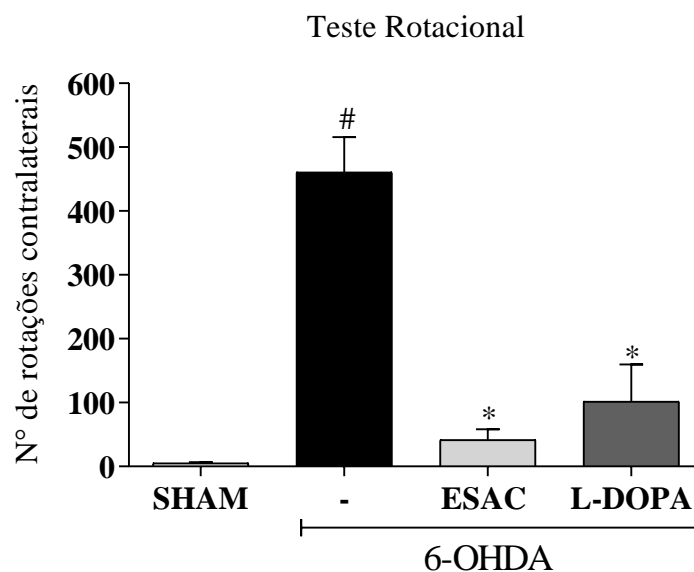
Fonte: O autor (2022). **Legenda:** Efeitos do ESAC na neurotoxicidade de células PC-12 expostas a 6-OHDA e induzidas por meio condicionado de células BV-2 ativadas por LPS. As células BV-2 foram pré-tratadas com ESAC (100 µg/mL) por 1 h e seguidas de ativação com LPS (0,5 µg/ml) por 24 h. O meio condicionado da cultura de células BV-2 foi coletado e as células PC-12 foram expostas ao meio condicionado e à 6-OHDA por 24 h, onde foram avaliadas a viabilidade celular e a inibição da liberação de óxido nítrico. Os resultados foram expressos como média ± EPM. *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. #  $p < 0,05$  vs controle negativo \*  $p < 0,05$  vs grupo estimulado,★ (meio condicionado),  $n = 4$ /grupo.

### **6.10 ESAC diminui rotações contralaterais em teste comportamental rotacional induzido por apomorfina de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.**

Na investigação realizada para o modelo *in vitro* o ESAC apresentou potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório ao diminuir a produção de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, EROS e NO) que contribuem para progressão de doenças neurodegenerativas, como DA e DP, assim, foi investigado preliminarmente se o ESAC também apresenta esse potencial efeito em modelo *in vivo* de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA, já que existem limitações a serem consideradas como a biodisponibilidade, travessia da barreira hematoencefálica e interação entre diferentes tipos celulares na progressão dessas doenças. Portanto, 2 h após a lesão com 6-OHDA os animais foram tratados com ESAC durante 14 dias na dose de 200 mg/Kg com base nos estudos anteriores do nosso laboratório.

Diante disso, após 14 dias da realização da indução do modelo de DP os animais do grupo 6-OHDA apresentaram aumento das rotações contralaterais ( $460,6 \pm 55,3$ ) induzidas por apomorfina quando comparamos com os animais do grupo SHAM ( $5,3 \pm 1,4$ ). Contudo, o tratamento dos animais com ESAC (200 mg/Kg v.o), logo após serem lesionados com 6-OHDA, diminuiu ( $41,6 \pm 16,6$ ) as rotações contralaterais a lesão, que foi superior ao grupo de animais tratados com L-DOPA (25 mg/Kg v.o), cuja diminuição foi significativa ( $101,0 \pm 58,1$ ) (**Figura 22**).

**Figura 22** – Efeito do ESAC no número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina.



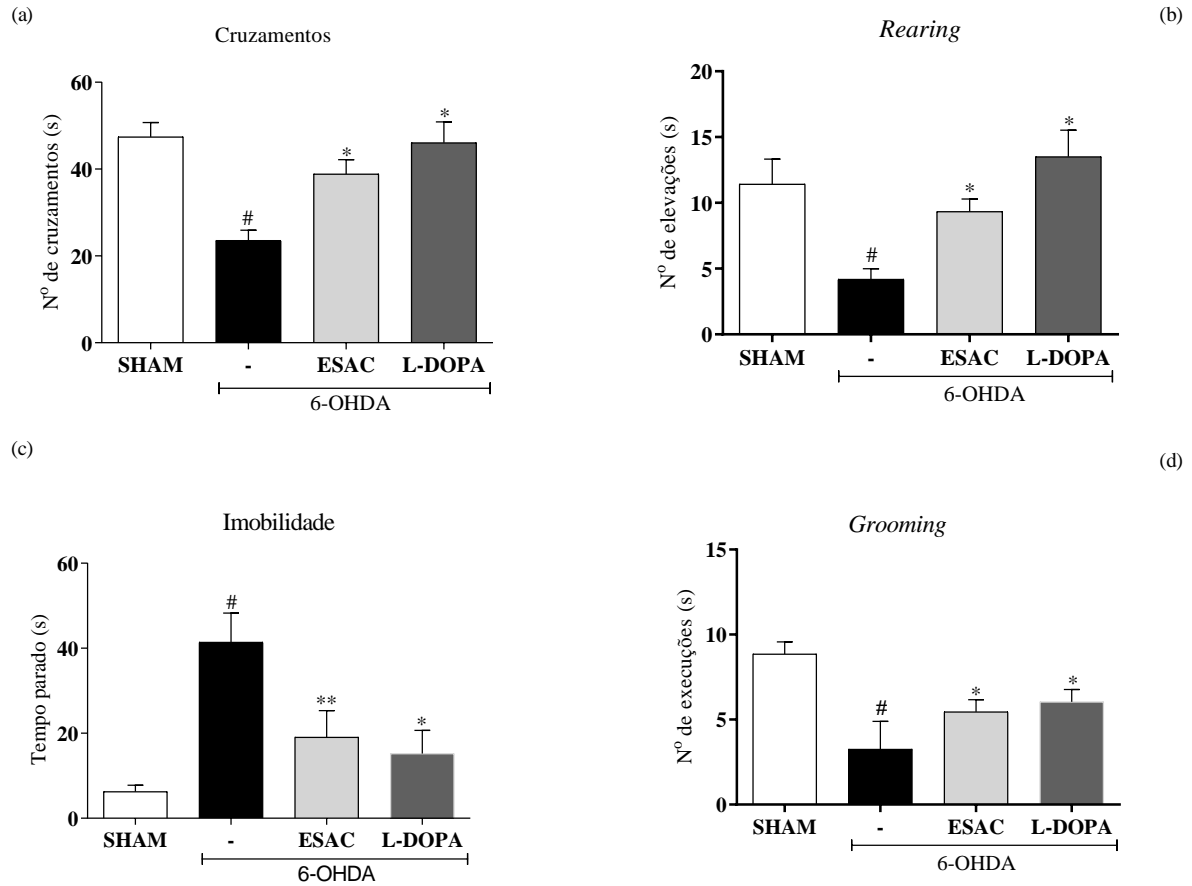
**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 10/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o); L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%) v.o, durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 14º dia, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.), onde o número total de rotações contralaterais à lesão foi contabilizado por um período de 60 minutos. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado Teste não paramétrico Mann-Whitney, # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

### 6.11 ESAC diminui déficit comportamental de ratos em modelo de DP induzido por 6-OHDA sobre a atividade locomotora (Teste do Campo Aberto).

No teste do campo aberto, os animais lesionados com 6-OHDA, apresentaram diminuição na atividade locomotora horizontal em 50,3% (cruzamentos:  $23,6 \pm 2,3$ ), bem como diminuição na atividade locomotora vertical (*rearing*:  $4,2 \pm 0,8$ ) em relação ao grupo SHAM (cruzamentos:  $47,4 \pm 3,3$ ; *rearing*:  $11,4 \pm 1,9$ ). Além disso, o tempo na imobilidade no grupo 6-OHDA teve uma elevação de 7,6 vezes (tempo parado:  $41,4 \pm 6,9$ ), em relação ao grupo SHAM (tempo parado:  $6,3 \pm 1,5$ ). Porém, o tratamento dos animais com ESAC (200 mg/kg, v.o) aumentou (cruzamentos:  $38,9 \pm 3,3$ ) o número dos cruzamentos em relação ao grupo 6-OHDA (cruzamentos:  $23,6 \pm 2,3$ ), elevando em mais de 32,2% a atividade locomotora horizontal dos animais. Resultados semelhantes foram verificados na avaliação da atividade locomotora vertical (*Rearing*), onde ESAC (200 mg/kg, v.o) (*Rearing*:  $9,3 \pm 0,9$ ) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do grupo 6-OHDA (*Rearing*:  $4,2 \pm 0,8$ ). Já na análise do tempo de imobilidade durante o teste comportamental, os animais tratados com ESAC (200 mg/kg, v.o), logo após lesão com 6-OHDA (tempo parado:  $19,1 \pm 6,3$  s) reduziram a imobilidade ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com o grupo 6-OHDA (tempo parado:  $41,4 \pm 6,9$  s).

Na avaliação do *Grooming* o grupo 6-OHDA ( $3,3 \pm 0,5$ ) apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo SHAM ( $8,9 \pm 0,7$ ). Porém, os resultados do *Grooming* em animais tratados com ESAC (200 mg/kg, v.o), logo após lesão com 6-OHDA (*Grooming*:  $5,5 \pm 0,3$ ) apresentaram redução significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo 6-OHDA. Visto isso, verificamos nesse estudo que o efeito exercido pelo ESAC pode ser equiparado ao grupo dos animais tratados com L-DOPA (25 mg/kg, v.o), medicamento de referência para o tratamento da DP, onde, foi observado também diferenças estatísticas em todos os parâmetros avaliados (cruzamentos:  $46,1 \pm 4,8$ ; *rearing*:  $13,5 \pm 2,0$ ; imobilidade:  $15,2 \pm 5,5$ ; *grooming*:  $6,1 \pm 0,3$ ) quando comparamos com o grupo 6-OHDA (**Figura 23**).

**Figura 23** – Efeito do ESAC na atividade locomotora no Teste de Campo Aberto (*Open field test*) de animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.



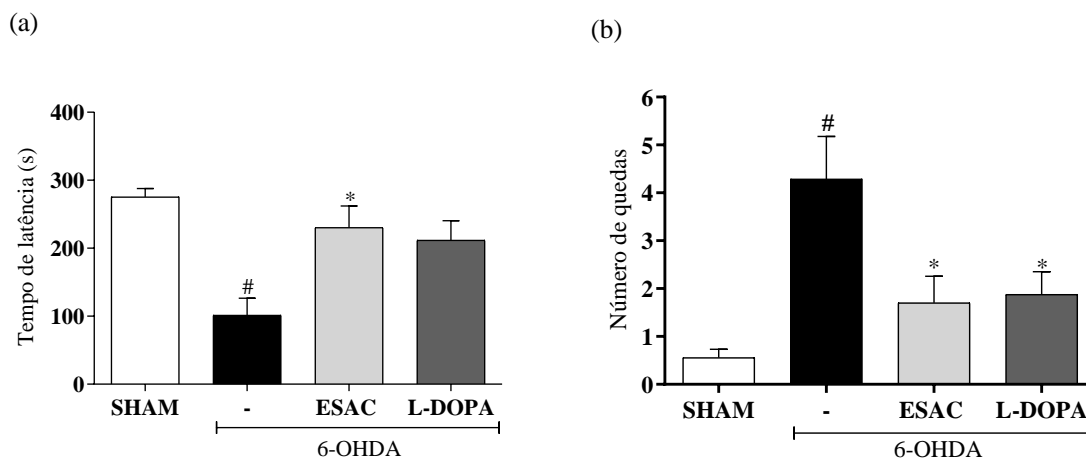
**Fonte:** O Autor (2022). **Legenda:** (a) Cruzamentos, (b) *Rearing*, (c) Tempo de imobilidade e (d) *Grooming*. Os ratos ( $n = 08/\text{grupo}$ , machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o), L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%) v.o durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 13º dia, os animais foram observados durante 300 s em campo aberto (cruzamentos, *rearing*, tempo de imobilidade e *grooming*). Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. Foi usado o Teste t de Student, <sup>#</sup> vs SHAM; <sup>\*</sup> vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

### 6.12 ESAC melhora atividade motora (Teste de *Rotarod*) de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.

Para maior análise da ação do ESAC na atividade motora de ratos submetidos a lesão nigroestriatal com 6-OHDA, os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos ao teste do *rotarod*. Na avaliação dos animais no grupo 6-OHDA (latência:  $101,5 \pm 25,1$  s) foi observado diminuição do tempo de latência no equipamento quando comparamos com o grupo SHAM (latência:  $275,6 \pm 12,3$  s). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg v.o), após lesão com 6-OHDA elevou (latência:  $230,3 \pm 31,8$  s) em mais de 220% o tempo de latência no equipamento em comparação com o grupo 6-OHDA. De forma semelhante, o grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) elevou o tempo de permanência (latência:  $212 \pm 28,4$ ) na barra giratória em comparação com o grupo 6-OHDA (**Figura 24a**).

Na avaliação do número de quedas os animais do grupo 6-OHDA (quedas:  $4,3 \pm 0,9$  s) apresentaram aumento quando comparamos com os animais do grupo SHAM (quedas:  $0,5 \pm 0,2$  s). Porém, esse efeito foi revertido nos animais tratados com ESAC, após lesão com 6-OHDA (quedas:  $1,7 \pm 0,5$  s). Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com L-DOPA, que também observamos diminuição no número de quedas (quedas:  $1,9 \pm 0,5$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA (**Figura 24b**).

**Figura 24** – Efeito do ESAC na atividade motora (Teste de Rotarod) de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.



**Fonte:** O Autor (2022). **Legenda:** (a) Tempo de latência, (b) Número de quedas. Os ratos (n = 08/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o), L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%) v.o, durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 13º dia, os animais foram observados durante 5 min no aparelho de rotarod (tempo de latência e número de quedas). Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. Foi usado Teste não paramétrico Mann-Whitney, <sup>#</sup> vs SHAM; <sup>\*</sup>vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .



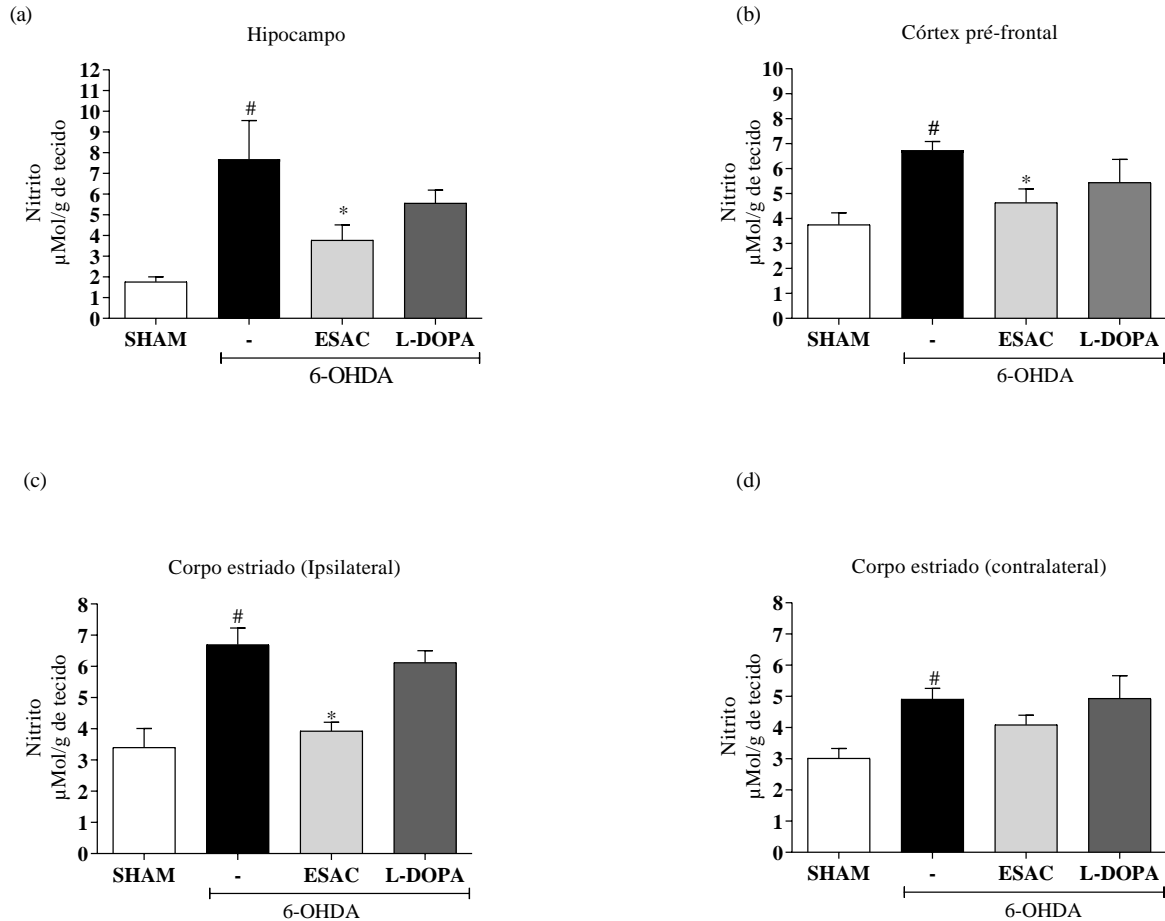
### **6.13 ESAC diminui a produção de nitrito nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.**

A administração de 6-OHDA unilateral causou aumento na concentração de nitrito em cerca de 75% no hipocampo dos animais lesionados com 6-OHDA unilateralmente (Nitrito:  $7,2 \pm 1,6$   $\mu\text{mol/g}$ ) quando comparado ao grupo SHAM (Nitrito:  $1,8 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/g}$ ). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/kg v.o), após lesão com 6-OHDA impediu esse aumento ( $4,3 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/g}$ ) em torno de 40%. Esse efeito não foi observado no grupo L-DOPA (25 mg/kg v.o), que não promoveu uma diminuição significativa (Nitrito:  $5,6 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/g}$ ) dos níveis de nitrito quando comparamos ao grupo 6-OHDA (**Figura 25a**).

No córtex pré-frontal foi verificado aumento significativo na concentração de nitrito (Nitrito:  $6,6 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/g}$ ) dos animais lesionados com 6-OHDA unilateralmente quando comparado ao grupo SHAM (Nitrito:  $3,8 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/g}$ ). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/kg v.o), após lesão com 6-OHDA impediu esse aumento (Nitrito:  $4,6 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/g}$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA. Efeito não observado nos animais do grupo L-DOPA (25 mg/kg v.o) (Nitrito:  $5,4 \pm 1,1$   $\mu\text{mol/g}$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA (**Figura 25b**).

Assim como foi observado no hipocampo e no córtex pré-frontal, houve um aumento na concentração de nitrito no corpo estriado ipsilateral e contralateral dos animais lesionados com 6-OHDA unilateralmente (Nitrito:  $6,7 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/g}$ ;  $4,9 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente) quando comparado ao grupo SHAM (Nitrito:  $3,4 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/g}$ ;  $3,0 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente). No entanto, o tratamento com ESAC (200 mg/kg v.o), após lesão com 6-OHDA impediu esse aumento apenas no corpo estriado ipsilateral (Nitrito:  $3,9 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/g}$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA. Já no grupo L-DOPA (25 mg/kg v.o), não observamos diminuição significativa dos níveis de nitrito quando comparamos ao grupo lesionado com 6-OHDA no corpo estriado ipsilateral (Nitrito:  $6,1 \pm 0,3$   $\mu\text{mol/g}$ ) e contralateral (Nitrito:  $4,9 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/g}$ ) (**Figura 25 c e d**).

**Figura 25** – Efeito do ESAC na produção de nitrito nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.



**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 08/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg); L-DOPA (25 mg/Kg) ou DMSO (2%) durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 14º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em quatro áreas: (a) Hipocampo, (b) Córtex Pré-Frontal, (c) Corpo Estriado Ipsilateral e (d) Corpo Estriado Contralateral para determinação dos níveis de nitrito. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado o Teste t de Student, # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significativo P<0,05.

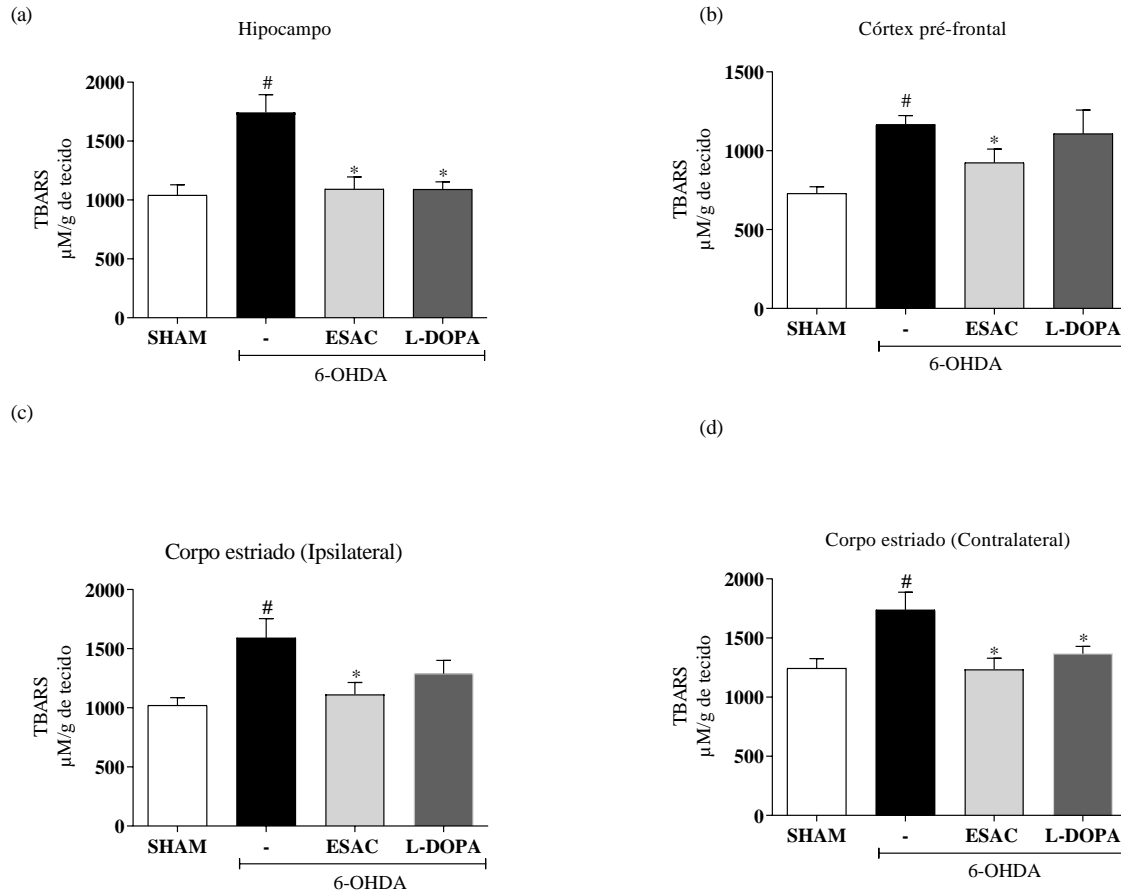
#### **6.14 ESAC reduz a peroxidação lipídica (método TBARS) em áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.**

A lesão unilateral com 6-OHDA provocou um aumento em cerca de 67% na concentração de MDA ( $1744,0 \pm 149,0 \mu\text{M/g}$ ) no hipocampo dos animais quando comparado ao grupo SHAM ( $p < 0,01$ ) ( $1041 \pm 87,31 \mu\text{M/g}$ ). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg, v.o), após lesão com 6-OHDA reduziu ( $1093,0 \pm 104,0 \mu\text{M/g}$ ) a elevação dos níveis de MDA em cerca de 37%. Resultados semelhantes foram observados no grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) ( $1091,0 \pm 63,3 \mu\text{M/g}$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA (**Figura 26a**).

No córtex pré-frontal foi observado aumento de cerca de 59% na concentração de MDA ( $1167,0 \pm 56,1 \mu\text{M/g}$ ) dos animais do grupo 6-OHDA em relação ao grupo SHAM ( $p < 0,01$ ) ( $729,5 \pm 42,0 \mu\text{M/g}$ ). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg), após lesão com 6-OHDA reduziu a elevação dos níveis de MDA induzida por 6-OHDA. Já no grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) não observamos redução nos níveis de MDA ( $1109,0 \pm 149,2 \mu\text{M/g}$ ) no córtex pré-frontal (**Figura 26b**).

Assim como foi observado nas outras áreas testadas, a lesão unilateral com 6-OHDA também provocou aumento na concentração de MDA no corpo estriado ipsilateral ( $1591,0 \pm 162,5 \mu\text{M/g}$ ) e contralateral ( $1737 \pm 150,1 \mu\text{M/g}$ ) ( $p < 0,01$ ), quando comparamos com os animais do grupo SHAM ( $1021,0 \pm 54,2 \mu\text{M/g}$ ;  $1245,0 \pm 80,3$ , respectivamente). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg), após lesão com 6-OHDA reduziu a elevação dos níveis de MDA induzida por 6-OHDA no corpo estriado ipsilateral ( $1115,0 \pm 99,8 \mu\text{M/g}$ ) e contralateral ( $1236,0 \pm 92,3 \mu\text{M/g}$ ). Já no grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) foi observado redução da peroxidação lipídica apenas no corpo estriado contralateral ( $1367,0 \pm 63,3 \mu\text{M/g}$ ), quando comparamos com o grupo 6-OHDA (**Figura 26 c e d**).

**Figura 26** – Efeito do ESAC nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.



**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 08/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o); L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%), v.o durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 14º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em quatro áreas: (a) Hipocampo, (b) Córtex Pré-Frontal, (c) Corpo Estriado Ipsilateral e (d) Corpo Estriado Contralateral para determinação dos níveis de peroxidação lipídica. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado o Teste t de Student, # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

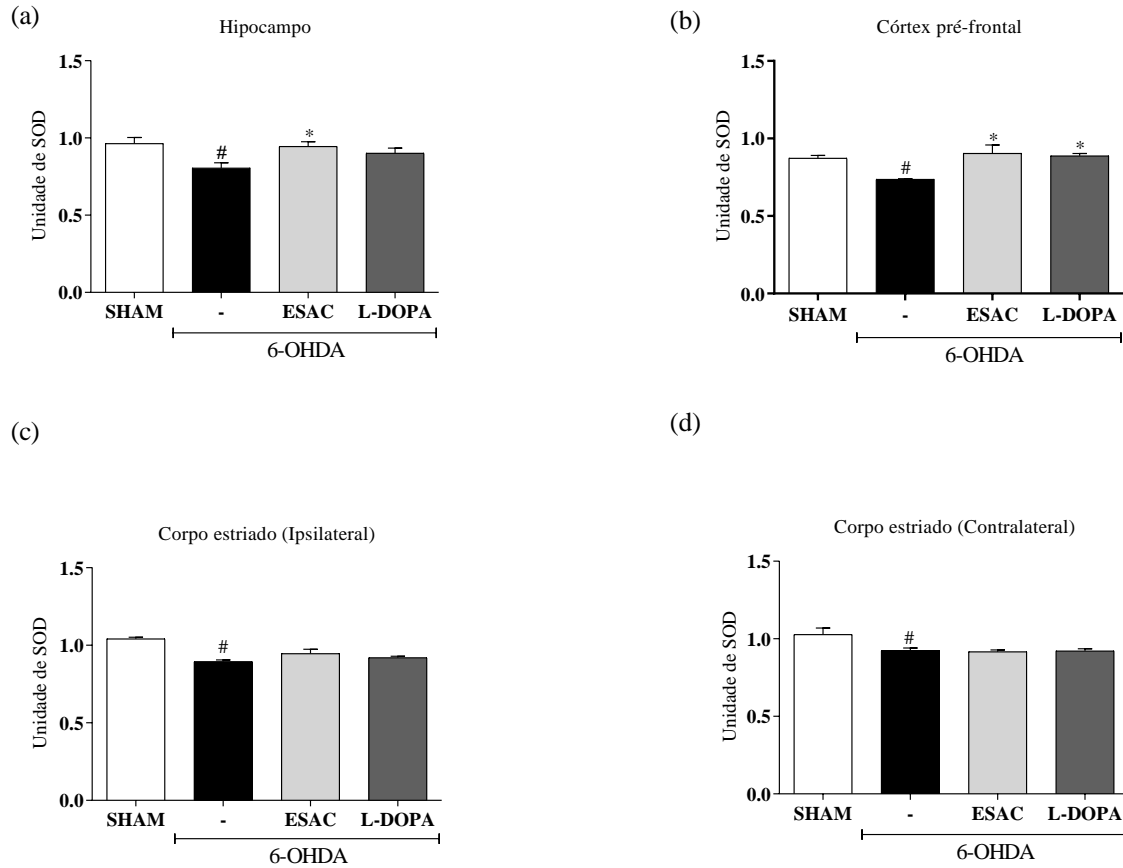
### **6.15 ESAC aumenta a atividade da superóxido dismutase nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.**

Uma redução significativa na atividade de SOD foi observada no hipocampo dos animais do grupo 6-OHDA ( $0,8 \pm 0,03$  u) em relação aos animais do grupo SHAM ( $1,0 \pm 0,03$  u). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg, v.o), após lesão com 6-OHDA reverteu esse efeito ( $1,0 \pm 0,03$  u) no hipocampo de animais induzidos ao modelo de DP por 6-OHDA. Já os animais do grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) não apresentaram efeitos significativos em prevenir ( $0,9 \pm 0,03$  u) a diminuição da atividade da SOD (**Figura 27a**).

No córtex pré-frontal foi observado redução na atividade da SOD dos animais do grupo 6-OHDA ( $0,7 \pm 0,003$  u) em relação aos animais do grupo SHAM ( $0,9 \pm 0,01$  u). Porém, o tratamento com ESAC (200 mg/Kg, v.o), após lesão com 6-OHDA reverteu esse efeito ( $0,9 \pm 0,05$  u), recuperando os níveis de SOD para valores próximos dos animais do grupo SHAM. Resultados semelhantes foram observados nos animais do grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o), onde foi observado prevenção na diminuição ( $0,9 \pm 0,01$  u) da atividade da SOD (**Figura 27b**).

No corpo estriado ipsilateral e contralateral foi observada uma redução na atividade da SOD dos animais do grupo 6-OHDA ( $0,9 \pm 0,01$  u;  $0,9 \pm 0,02$  u, respectivamente) em relação aos animais do grupo SHAM ( $1,04 \pm 0,01$  u;  $1,03 \pm 0,04$  u, respectivamente). Esse efeito não foi revertido ( $0,9 \pm 0,03$  u;  $0,9 \pm 0,01$  u) pelo tratamento com ESAC (200 mg/kg, v.o), após lesão com 6-OHDA, nas duas áreas analisadas, quando comparamos com os animais do grupo 6-OHDA. De forma semelhante, nos animais do grupo L-DOPA (25 mg/kg, v.o) não foram observados prevenção da redução da atividade da SOD ( $0,92 \pm 0,01$  u;  $0,9 \pm 0,01$  u) induzida por 6-OHDA (**Figura 27c e d**).

**Figura 27** – Efeito do ESAC na atividade da superóxido dismutase nas áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.



**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 08/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o); L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%), v.o durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 14º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em quatro áreas: (a) Hipocampo, (b) Córtex Pré-Frontal, (c) Corpo Estriado Ipsilatera e (d) Corpo Estriado Contralateral para determinação da atividade da superóxido dismutase. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado o Teste t de Student. # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

### **6.16 Avaliação bioquímica do sangue de ratos tratados com ESAC e submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.**

Os resultados da análise de parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, ureia, creatinina, TGO, TGP e fosfatase alcalina) a partir de amostras coletadas de sangue dos animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson não foram observadas alterações bioquímicas no grupo 6-OHDA quando comparamos com o grupo SHAM. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com ESAC (200 mg/Kg, v.o), após lesão com 6-OHDA, quando comparamos com os animais do grupo 6-OHDA. Nesse contexto, também não foram observadas alterações bioquímicas significativas nos animais do grupo L-DOPA (25 mg/Kg, v.o), com exceção para os níveis de ureia, cujo dado observado se encontra dentro dos valores de referência 2. (12,6-24,6) no estudo realizado por Lima (2018) em ratos machos da linhagem *Wistar* do biotério central da UFC.

Na avaliação de eletrólitos (cálcio, magnésio, fósforo, sódio e potássio) a partir de amostras coletadas de sangue dos animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson não foi observada alterações significativas nos níveis dos eletrólitos no grupo 6-OHDA quando comparamos com o grupo SHAM. De forma semelhante, os animais tratados com ESAC (200 mg/Kg, v.o), após lesão com 6-OHDA como também nos animais tratados com L-DOPA (25 mg/Kg, v.o) não foram observadas alterações nos níveis dos eletrólitos ao compararmos com o grupo 6-OHDA.

Os resultados encontrados foram bastante promissores, no entanto os estudos do efeito neuroprotetor e toxicidade do ESAC devem ser prosseguidos, pois o presente estudo, trata-se de uma investigação preliminar, onde foi investigado o efeito do ESAC na diminuição do estresse oxidativo, associado a uma melhora comportamental, que podemos relacionar a presença de efeito neuroprotetor exercido pelo nosso extrato. Diante dos resultados encontrados é interessante o entendimento a nível molecular de como o ESAC age reduzindo a produção de oxidantes e prevenindo a diminuição da atividade de SOD, que no presente estudo podemos associar a uma melhora no déficit comportamental ocasionado pela lesão com 6-OHDA.

**Tabela 5** – Parâmetros bioquímicos de ratos machos da linhagem *Wistar* utilizados no modelo de doença de Parkinson.

Parâmetros (Unidade)	SHAM Média ± EPM	6-OHDA Média ± EPM	ESAC 200 Média ± EPM	L-DOPA 25 Média ± EPM
<b>Glicose (mg/dL)</b>	153,0 ± 4,4	153,8 ± 1,6	142,0 ± 8,2	141,8 ± 11,5
<b>Col. total (mg/dL)</b>	99,0 ± 7,5	101,8 ± 3,2	104,8 ± 5,8	89,8 ± 2,3
<b>Ureia (mg/dL)</b>	51,2 ± 4,16	40,9 ± 2,8	33,8 ± 3,9	15,88 ± 1,2*
<b>CRE (mg/dL)</b>	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,02
<b>TGO (U/I)</b>	184,3 ± 2,8	220,3 ± 25,2	195,8 ± 16,5	199,7 ± 13,4
<b>TGP (U/I)</b>	60,3 ± 2,4	67,5 ± 6,7	68,8 ± 5,2	65,8 ± 3,1
<b>F. Alcalina (U/I)</b>	309,8 ± 32,6	251,5 ± 7,0	254,1 ± 8,6	263,5 ± 14,6

**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 06/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg); L-DOPA (25 mg/Kg) ou DMSO (2%) durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 14º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados foram coletados o sangue dos animais para análise bioquímica. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado o Teste t de Student, # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significante P<0,05. Col. Total: colesterol total, CRE: creatinina, F. alcalina: fosfatase alcalina.



**Tabela 6** – Dados dos eletrólitos quantificados em ratos machos da linhagem *Wistar* utilizados no modelo de doença de Parkinson.

Parâmetros (Unidade)	SHAM Média ± EPM	6-OHDA Média ± EPM	ESAC Média ± EPM	L-DOPA Média ± EPM
<b>Cálcio (mEq/l)</b>	11,6 ± 0,2	11,3 ± 0,3	11,5 ± 0,5	11,5 ± 0,1
<b>Magnésio (mEq/l)</b>	3,2 ± 0,03	3,2 ± 0,06	3,6 ± 0,5	4,0 ± 0,7
<b>Fósforo (mEq/l)</b>	7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,2	8,0 ± 0,5	7,6 ± 0,4
<b>Sódio (mEq/l)</b>	129,2 ± 4,3	134,7 ± 0,4	138,8 ± 8,4	130,6 ± 5,9
<b>Potássio (mEq/l)</b>	6,3 ± 0,170	6,4 ± 0,1	6,9 ± 0,4	6,6 ± 0,2

**Fonte:** O autor (2022). **Legenda:** Os ratos (n = 06/grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com ESAC (200 mg/Kg v.o); L-DOPA (25 mg/Kg v.o) ou DMSO (2%) v.o, durante 14 dias, com início 2 horas após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 14º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e foram coletados o sangue dos animais para análise dos eletrólitos. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Foi usado o Teste t de Student, # vs SHAM; \*vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significante P<0,05. mEq/l: miliequivalentes por litro.

## 7- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram evidenciar que o extrato seco padronizado de *A. cearensis* (ESAC) e/ou ativos (CM, AMB e AV) tem atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante em modelo de neuroinflamação em células microgлияis (linhagem BV-2) estimuladas por LPS, através da redução da produção de nitrito, diminuindo a expressão de iNOS, bem como de outros mediadores inflamatórios liberados pelas células BV-2, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6) e atividade sequestradora de radicais livres (ânion superóxido e radical hidroxila). Além disso, o ESAC presente no meio condicionado (oriundo de células BV-2) apresentou efeito antineuroinflamatório ao diminuir a produção de nitrito em células neuronais (linhagem PC-12). Podemos destacar ainda, que o ESAC parece interferir nos mecanismos moleculares de células microgлияis diminuindo a expressão da via de sinalização das MAP quinases. Diante do potencial efeito exercido pelo ESAC no modelo *in vitro*, investigamos de forma preliminar o efeito do ESAC no modelo animal de DP induzido por 6-OHDA e observamos que o ESAC apresenta efeito antioxidante, associado a uma melhora comportamental, onde parâmetros bioquímicos analisados não foram alterados nos animais submetidos ao modelo de estudo.

Estudos mostram que a neuroinflamação exacerbada no SNC está associada a distúrbios neurodegenerativos, como doença de Parkinson e doença de Alzheimer. As micrógлияs são células que fazem parte do sistema imune inato que a princípio tem função de proteger o SNC de possíveis danos, no entanto, quando essas células são ativadas excessivamente, liberam vários mediadores inflamatórios e potencialmente neurotóxicos, incluindo proteases, citocinas, EROs e ERNs (Zhang *et al.*, 2013). O lipopolissacarídeo, uma endotoxina bacteriana, é amplamente utilizado como estímulo inflamatório para ativação microgлияl (LIVELY; SCHLICHTER, 2018). Portanto, este modelo experimental tem sido uma ferramenta útil para entender o papel da neuroinflamação na progressão de doenças neurológicas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson.

O óxido nítrico está associado a efeitos tanto benéficos como deletérios em humanos. No sistema SNC, o aumento da expressão da iNOS e o acúmulo de NO exacerbam o microambiente neuroinflamatório, o que contribui para a morte celular neuronal. A toxicidade do NO é aumentada quando este é combinado com o ânion superóxido, gerando o ânion peroxinitrito (HSIEH; YANG, 2013). A decomposição do peroxinitrito resulta na formação de algumas espécies altamente reativas, como os radicais hidroxila (THARMALINGAM *et al.*, 2017). Estudos anteriores (KIENZL *et al.*, 1999; COLIN, 2019) mostraram que níveis mais altos de radicais hidroxila e menor atividade da superóxido dismutase, uma oxidoredutase

responsável por dismutar o ânion superóxido, parecem contribuir para o aparecimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson e doença de Alzheimer.

Diante disso, o ESAC e ativos (CM e AMB), exceto AV reduziram a produção de nitrito, que mensura indiretamente a produção de NO, elevada pela exposição ao LPS. Esse efeito foi verificado sem afetar significativamente a viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT. Corroborando esses dados, Amaral (2017), observou atividade anti-inflamatória exercida pelo ESAC e ativos (CM e AV), ao diminuir EROs e mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos, de forma semelhante ao nosso resultado esse efeito não foi associado a citotoxicidade.

Além disso, o ESAC e os constituintes químicos (CM, AMB e AV) apresentaram atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais hidroxila e ânion superóxido. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores desenvolvidos por nosso laboratório, além de outros autores que mostraram o efeito anti-inflamatório e antioxidante do AMB e isocampferídio (flavonol) de *Amburana cearensis* em células mesencefálicas de ratos expostos à neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), neutrófilos humanos e/ou hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub> em ratos (LEAL *et al.*, 2009, CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010; LEAL *et al.*, 2008; AMARAL 2017).

Portanto, a redução da concentração de nitrito e a atividade sequestradora de radicais hidroxila e ânion superóxido exercida pelo ESAC e seus ativos sugerem que os efeitos anti-inflamatórios do ESAC reduzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs) que desempenham um papel importante na morte neuronal induzida por neuroinflamação (YUSTE *et al.*, 2015).

Além de EROs e NO, as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$ , são iniciadores da resposta inflamatória e os mediadores do desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. Portanto, a superprodução de citocinas pró-inflamatórias são consideradas alvos de interesse na pesquisa de novos fármacos para o tratamento de doenças neurológicas no cérebro (BACHILLER *et al.*, 2018).

Assim, nosso estudo também investigou o efeito do ESAC, CM ou AMB na liberação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em células BV-2 estimuladas por LPS. É importante ressaltar que ESAC, CM e AMB inibiram a produção induzida por LPS de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), mas não observamos efeitos significativos na redução de IL-10 (citocina anti-inflamatória) causada por LPS. Visto isso, um aspecto a ser considerado para o resultado encontrado é que a BV-2 tem baixa produção de IL-10, como foi observado nesse estudo, porém, trabalhos mostram a produção de IL-10 detectável, como no estudo realizado por Zhang e colaboradores (2020).

Coletivamente, esses dados sugerem que ESAC e seus princípios ativos CM e AMB podem proteger contra a morte neuronal considerando que IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  agem sinergicamente como agentes neurotóxicos mediados pelo menos em parte pelo NO (CHAO *et al.*, 1995). Esta hipótese é corroborada por estudos anteriores (LEAL *et al.*, 2005) onde descrevemos as atividades anti-inflamatória e antioxidante do AMB de *A. cearensis* em células mesencefálicas de ratos expostos à neurotoxina 6-OHDA.

Além disso, estudos demonstraram que o TNF- $\alpha$ , um fator clássico secretado pela micróglia ativada, pode induzir um aumento significativo na secreção de  $\alpha$ -sinucleína (um marcador de DP) de células PC-12 e SHSY5Y diferenciadas (YEO *et al.*, 2018; AHMED *et al.*, 2020). Portanto, diante da importância em controlar a produção dessa citocina, nosso estudo apresentou um resultado de extrema relevância, pois o ESAC, assim como CM e AMB diminuem a produção de TNF- $\alpha$  em células BV-2 estimuladas com LPS.

A produção de óxido nítrico no organismo é catalisada por uma família de enzimas chamadas de NOS, estas podem ser divididas em três distintas isoformas: eNOS (produzida no tecido endotelial); nNOS (produzida nos neurônios) e iNOS (óxido nítrico sintase induzível). A iNOS possui atividade em macrófagos regulada por receptores do tipo TLR-4 que respondem estímulos do LPS, possuindo papel fundamental na resposta inflamatória de monócitos e macrófagos através da ativação de vias de sinalizações intracelulares.

Diante dos resultados inéditos e promissores obtidos, foi investigado como o ESAC e ativos (CM e AMB) estariam reduzindo nitrito em células microgliciais (linhagem BV-2) estimuladas por LPS. Diante disso, nossos resultados mostraram que o LPS aumentou a expressão de iNOS em células microgliciais BV-2, e o pré-tratamento com ESAC e AMB diminuiu a expressão desta enzima. Enquanto isso, a adição de CM em células BV-2 não afetou a expressão de iNOS. Em conjunto, esses resultados demonstram que a inibição da produção de NO pelo extrato de *A. cearensis* e AMB em células microgliciais está relacionada, pelo menos em parte, à sua capacidade de reduzir a expressão de iNOS em células microgliciais. Estudos adicionais são necessários para descrever como CM reduziu a produção de nitrito em células BV-2 estimuladas por LPS sem afetar a expressão de iNOS.

A síntese de NO pode ser limitada pela disponibilidade de arginina e/ou pelo nível de expressão da proteína iNOS. Durante a síntese de NO, a arginase-1 (expressa em células microgliciais) compete com a iNOS pela L-arginina (RATH *et al.*, 2014; MILLS; LENZ; LEY, 2015). Diante disso, observamos que as células micrógliciais estimuladas por LPS aumentaram a expressão de iNOS (dado mostrado anteriormente), marcando o perfil M1 (pró-inflamatório e causou uma redução na atividade da arginase (mensurado pelo ensaio dos níveis de ureia)

marcando o perfil M2 (anti-inflamatório), e apenas o AMB promoveu aumento da atividade da arginase, apesar de ESAC e CM apresentarem uma tendência de aumento.

Nesse contexto, nossos achados são corroborados por estudos prévios realizado por nosso laboratório, onde foi demonstrado efeito imunomodulador exercido pelo ESAC e ativos (CM e AV). Nesse estudo, Amaral (2017), demonstrou que o ESAC, CM e AV apresentaram efeito imunomodulador em cultura primária de neutrófilos humanos com inibição da desgranulação neutrofílica e da produção de EROs induzida por PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato).

As atividades anti-inflamatórias e antioxidantes do ESAC descritas no presente estudo em células microgliciais são corroboradas por um estudo anterior de Pereira e colaboradores (2017) que descreveram o efeito neuroprotetor do extrato de semente de *A. cearensis* contra danos neuronais induzidos por glutamato em culturas primárias de células do cerebelo, o que foi associado à preservação glial e neuronal, e atividade antioxidante. No presente estudo o ESAC mostrou um efeito anti-inflamatório promissor, por isso, investigamos os mecanismos moleculares mediados pelo ESAC em células microgliciais (linhagem BV-2). Existem diversos estudos publicados descrevendo a atividade anti-inflamatória ou antioxidante de *A. cearensis* ou de seus princípios ativos (AMARAL, 2017; LEAL *et al.*, 2009; LEAL *et al.*, 2005; LIMA, 2013; LEAL *et al.*, 2008; LEAL *et al.*, 2003b; BALION *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021). No entanto, esses estudos se limitam principalmente a mostrar seus efeitos finais sem esclarecer o mecanismo molecular que o extrato de *A. cearensis* atua.

Percebendo a importância da investigação de mecanismos moleculares o presente estudo investigou o papel das vias de sinalização de TLR-4, NF- $\kappa$ B e MAPKs no efeito anti-inflamatório do ESAC em células microgliciais (linhagem BV-2) estimuladas por LPS.

A ligação de TLR-4 na membrana celular por LPS em células BV-2 ativa várias cascatas de sinalização, incluindo a via NF- $\kappa$ B através do complexo de sinalização MyD88-IRAK-TRAF6-TAK1, levando à ativação do complexo de quinases I $\kappa$ B (IKK). A ativação de IKK inclui a fosforilação de NF- $\kappa$ B que leva à sua translocação para o núcleo. Como fator de transcrição, o NF- $\kappa$ B estimula a síntese de mediadores pró-inflamatórios, incluindo NO, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e a secreção de EROs. Além do NF- $\kappa$ B, o LPS é um potente ativador das vias de sinalização das MAPKs, que por sua vez modulam a ativação de vários fatores de transcrição, incluindo a proteína ativadora-1 (AP-1), STAT-1 e NF- $\kappa$ B. A AP-1 regula a expressão de citocinas desempenhando um papel fundamental na neuroinflamação (AHMED *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2019; RAHIMIFARD *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2019). No presente estudo, foi

possível determinar que o pré-tratamento com ESAC inibiu significativamente a fosforilação estimulada por LPS de duas vias da MAP quinase (JNK e ERK1/2) em células microgliais. No entanto, ESAC não interferiu no aumento da expressão de TLR-4 ou fosforilação de NF- $\kappa$ B induzida por LPS.

Estudos na literatura demonstram que a produção excessiva de mediadores inflamatórios atua como indutora da ativação de MAPKs que por sua vez amplificam e prolongam o processo inflamatório (BATISTA *et al.*, 2019). Esse ciclo vicioso leva a danos neuronais e morte, que é uma marca registrada de doenças neurodegenerativas, como DA e DP (BATISTA *et al.*, 2019). Tanto JNK quanto ERK promovem a fosforilação da proteína precursora de amiloide que, quando clivada por  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases, produz o peptídeo neurotóxico  $\beta$ -amilóide que desempenha um papel fundamental na DA. Portanto, a inibição das vias das MAPKs pelo ESAC indica que ele pode ser um promissor anti-inflamatório, útil para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Os resultados obtidos até o momento demonstraram que a via das MAPKs (ERK1/2 e JNK) possui papel importante no efeito anti-inflamatório do ESAC (marcadores ativos- CM, AV e AMB) em células microgliais, efeito evidente pela redução significativa da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), bem como redução da produção de óxido nítrico/nitrito que está relacionada com a inibição da expressão de iNOS. Além disso, os resultados mostraram que esses efeitos podem estar relacionados a presença dos ativos (CM e AMB), pois demonstramos que esses diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), bem como a produção de óxido nítrico/nitrito, vimos ainda, que a redução de nitrito exercida pelo AMB está relacionada com inibição da expressão de iNOS, assim com também aumento da atividade da arginase.

Um grande conjunto de evidências (SOUSA; BRAGA; SOBRINHO, 2016; SHIE *et al.*, 2011) sugere que a interação entre micróglia ativada e neurônios está relacionada à patogênese de vários distúrbios neurodegenerativos, já que a micróglia, quando ativada, secreta mediadores inflamatórios que podem causar danos ou até a morte de neurônios. Para avaliar essa condição neurodegenerativa *in vitro*, realizamos testes simulando uma parte do microambiente neuronal através da exposição de células neuronais (linhagem PC-12) ao meio condicionado de células microgliais BV-2. O meio de cultura das células BV-2 ativadas pelo LPS, chamado meio condicionado, foi adicionado na cultura de células neuronais (linhagem PC-12) exposta à neurotoxina 6-OHDA e, em seguida, foi avaliada a neurotoxicidade deste meio condicionado. O pré-tratamento com ESAC em cultura de células BV-2 resultou na inibição da neurotoxicidade em células PC-12 causada pela 6-OHDA. Como o ESAC diminui

significativamente a liberação de mediadores inflamatórios nas BV-2, esse efeito anti-inflamatório explica, pelo menos parcialmente, a neuroproteção observada. No entanto, é possível que o ESAC presente no meio condicionado possa estar atuando diretamente nas células PC-12 exercendo assim também um efeito neuroprotetor de forma direta.

O efeito anti-inflamatório do ESAC apresentado no estudo do meio condicionado está associado, pelo menos em parte, à presença de AMB e CM no extrato da planta, mas a importância farmacológica de outros constituintes químicos de *A. cearensis* não pode ser excluída.

Estudos com compostos fenólicos como flavanoides tem mostrado que esses são capazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios *in vitro* bem como *in vivo*, dessa forma, diante do efeito anti-inflamatório e antioxidante encontrado nesse trabalho exercido pelo ESAC em cultura de células micrógliais (linhagem BV-2) e neuronais (linhagem PC-12), além do efeito modulador determinado em estudo anterior do nosso laboratório em cultura primária de neutrófilos humano, o próximo passo realizado nesse estudo foi avaliar o efeito do ESAC em modelos animais experimentais de doenças neurodegenerativas, investigando o potencial anti-inflamatório, antioxidante e neuroproteção.

Diante disso, prosseguimos nossos estudos avaliando o efeito do ESAC (200 mg/Kg) de forma preliminar em modelo animal de neurotoxicidade induzindo parkinsonismo experimental por 6-OHDA. Dessa forma, nosso estudo permitiu evidenciar que o tratamento com ESAC, após lesão com 6-OHDA, cujo tratamento foi durante 14 dias, apresentou efeito neuroprotetor e antioxidante, avaliado através de testes comportamentais (teste da apomorfina, teste do campo aberto e teste do *rotarod*) e quantificação do efeito antioxidante por meio da realização de dosagens neuroquímicas de áreas cerebrais vitais na progressão da doença de Parkinson, como hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado. Observamos ainda, que o ESAC no estudo preliminar para investigação de alterações em parâmetros bioquímicos e eletrólitos do sangue de animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson lesionado com 6-OHDA, não alterou os parâmetros analisados. Além disso, destaca-se que o efeito na diminuição do déficit comportamental exercido pelo ESAC em algumas situações foi comparável ao medicamento de referência L-DOPA, que é utilizado na clínica para reposição de dopamina, não sendo capaz de diminuir a progressão da doença. Dessa forma, observamos ainda que o ESAC (200 mg/Kg), apresentou melhor atividade antioxidante do que a exercida pela L-DOPA, cuja literatura tem mostrado que a utilização a longo prazo desse medicamento está relacionada a efeitos colaterais, como o aumento do estresse oxidativo.

A 6-OHDA, análogo hidroxilado da dopamina, induz degeneração progressiva em neurônios dopaminérgicos de forma seletiva, após injeção unilateral no corpo estriado, por meio de uma combinação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, levando a produção de nitrito, peroxidação da membrana e a consequente depleção de enzimas antioxidantes, que afetam áreas vitais na progressão da doença de Parkinson, comprometendo a atividade motora e causando danos na memória dos pacientes que sofrem dessa doença (BALTAZAR; FLORES; OLIVOO, 2017). Diante disso, passamos a investigar de forma preliminar o efeito do ESAC em reverter os déficits comportamentais e estresse oxidativo desencadeados pela 6-OHDA.

Diante do exposto o teste da apomorfina, realizado no nosso estudo consiste em um teste padrão-ouro para o modelo de DP induzido por 6-OHDA, sendo bastante confiável e robusto (DUTY; JENNER, 2011). No presente estudo, os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram aumento do número de rotações contralaterais à lesão, como descrito em outros estudos, que também descreveram um aumento das rotações contralaterais à lesão com 6-OHDA, após duas ou três semanas (AMARAL, 2021; FROTA, 2015).

O tratamento com ESAC diminuiu em torno de 90% o número de rotações contralaterais de animais submetidos ao modelo de DP em ratos. Resultados semelhantes, foram encontrados no estudo realizado por Calou (2013), onde o extrato hidroalcoólico e seco de *Myracodroun urundeuva*, ricos em fenóis e taninos assim como o ESAC, apresentaram diminuição no número de rotações contralaterais em torno de 80% e 90%, respectivamente.

O teste do campo aberto é usado em modelos animais para demonstrar a eficácia terapêutica das drogas em estudo na melhora do desempenho motor dos animais submetidos ao modelo de DP (TATEM *et al.*, 2014). Ao avaliar a atividade exploratória dos animais no campo aberto nesse estudo foram observadas diferenças estatísticas nos animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA na atividade exploratória horizontal (cruzamentos), vertical (*rearing*), autolimpeza (*grooming*) e no tempo de imobilidade, cujos estudos da literatura corroboram com nossos resultados (FROTA, 2015; VASCONCELOS, 2018). Porém, o ESAC (200 mg/Kg) reverteu os déficits comportamentais dos animais lesionados com 6-OHDA, aumentando o número de cruzamentos, *rearing*, *grooming* e diminuindo o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao modelo. Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com L-DOPA (25 mg/Kg), o que valida nosso modelo de estudo. Visto isso, destaca-se a importância do nosso estudo, onde demonstramos que o ESAC reverteu os déficits motores de forma semelhante a L-DOPA, medicamento de referência para o tratamento da DP.

Existem poucos estudos na literatura dos efeitos da *A. cearensis* no SNC, dentre esses estudos, podemos destacar o realizado por Lucetti (2010), na qual investigou o efeito da CM



(marcador ativo da *A. cearensis*) no teste comportamental do campo aberto, seus dados mostraram que a CM diminuiu os parâmetros analisados, sugerindo possível efeito sedativo, resultado que diverge dos encontrados no nosso estudo. No entanto, é válido ressaltar que o ESAC apresenta além da CM como ativo, outros constituintes químicos que podem estar contribuindo para o efeito observado no presente estudo. Além disso, a dose de CM utilizada no estudo de Lucetti (2010) e as quantidades dos constituintes químicos no ESAC são diferentes.

Os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram também déficit na coordenação motora, ao diminuir o tempo de permanência na barra giratória e aumentar o número de quedas no aparelho de *rotarod* e o tratamento com ESAC melhorou o desempenho motor dos animais avaliados no teste do *rotarod*, sugerindo assim novamente o seu efeito neuroprotetor. A L-DOPA, como esperado, também melhorou o déficit motor dos animais nesse teste, como descrito na literatura (CEZÀRIO, 2017; VASCONCELOS, 2018).

Estudos realizados anteriormente corroboram com os nossos resultados onde foi demonstrado que o extrato metanólico de *Stereospermum suaveolens*, rico em flavonoides, assim como o ESAC, melhorou a coordenação motora de animais submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA, estudo esse realizado por Shalavadi e colaboradores (2012), destacando a importância do uso de extratos vegetais para a terapêutica de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson e o potencial neuroprotetor de espécies vegetais, que podem ser atribuídos a presença de ativos presentes nessas espécies.

Já está bem descrito na literatura que a 6-OHDA inibe o complexo I da mitocôndria, levando a depleção mitocondrial do ATP e aumento de estresse oxidativo, elevando a produção de nitrito, EROs, peroxidação da membrana e redução da atividade da SOD, uma importante enzima com função de dismutar o ânion superóxido, cujo radical é precursor para síntese de outros oxidantes (SHALAVADI *et al.*, 2012). Diante disso, investigamos o efeito do ESAC no estresse oxidativo desencadeado pela lesão com 6-OHDA.

Estudos anteriores demonstraram que cérebros de pacientes com doença de Parkinson apresentam números elevados de marcadores de estresse oxidativo e diminuição de enzimas antioxidantes, como glutathiona redutase, catalase e superóxido dismutase. Dentre esses estudos, podemos destacar o realizado por Mizuno e colaboradores (1989) em mitocôndrias isoladas a partir de neurônios do corpo estriado de pacientes que morreram de DP, onde foi verificada deficiência do complexo I das mitocôndrias analisadas, cuja deficiência contribuiu para aumento de EROs e consequente estresse oxidativo.

No presente estudo a administração de 6-OHDA promoveu aumento da concentração de nitrito no hipocampo, córtex pré-frontal, corpo estriado ipsilateral e contralateral de animais

submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA e esse efeito foi revertido pelo ESAC em todas as áreas analisadas, exceto no corpo estriado contralateral. Visto isso, a redução do nitrito em regiões cerebrais comprometidas, é corroborada por nossos resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, no qual o ESAC também reduziu a quantidade de nitrito produzida por células microgliais (linhagem BV-2) (DE ARAUJO *et al.*, 2022). Por outro lado, a L-DOPA não diminuiu a concentração de nitrito nas diferentes áreas analisadas.

A geração excessiva de nitrito pode causar danos as células neuronais, inclusive morte celular, através de via apoptótica ou necrótica (ARMENTA *et al.*, 2014). Diante disso, destaca-se a importância do nosso estudo, onde demonstramos que o ESAC diminui a produção de nitrito, mediador inflamatório que contribui para progressão de doenças neurodegenerativas como a DP. Vale ressaltar ainda, que o ESAC além de apresentar melhora no déficit motor comparável ao da L-DOPA, verificado no estudo comportamental, apresenta um diferencial que é o efeito antioxidante observado no presente estudo que não foi exercido pela L-DOPA.

O cérebro é um dos órgãos mais vulneráveis aos efeitos dos oxidantes (EROs e nitrito), por causa da sua alta demanda de oxigênio e sua abundância de células suscetíveis a peroxidação lipídica (UTTARA *et al.*, 2009). Diante disso, é importante o estudo de potenciais drogas com ação antioxidante em modelo de lesão por 6-OHDA, cujos efeitos causam toxicidade dopaminérgica aumentando a peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

A neurotoxicidade induzida por 6-OHDA provocou a peroxidação lipídica importante no hipocampo, córtex pré-frontal, corpo estriado ipsilateral e contralateral que foi reduzida pelo ESAC. Essa redução foi corroborada por estudo anterior do nosso laboratório, que mostrou que o AMB (marcador ativo do ESAC) apresentou efeito antioxidante em modelo de hepatotoxicidade induzida por CCL4 (Leal *et al.*, 2003b).

O ânion superóxido, consiste em uma molécula altamente instável e é precursora para a formação de diversas outras EROs, incluindo radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}^\cdot$ ) e radical hidroperoxil ( $\text{HOO}^\cdot$ ), diante disso, aumentar a atividade da SOD que tem função de dismutar esse radical é extremamente importante em áreas cerebrais na qual o estresse oxidativo está aumentado. Dessa forma, avaliamos o efeito do ESAC na atividade da SOD no hipocampo, córtex pré-frontal, corpo estriado ipsilateral e contralateral dos animais submetidos ao modelo de DP usando a neurotoxina 6-OHDA, onde foi observado que o ESAC aumentou a atividade da SOD e esse aumento dependeu da área cerebral estudada, efeito esse observado no hipocampo e córtex pré-frontal. Por outro lado, a L-DOPA reverteu a diminuição da atividade da SOD apenas no córtex pré-frontal, não apresentando resultado significativo nas outras áreas cerebrais analisadas.

Diante do resultado encontrado podemos destacar que o hipocampo é responsável pelo aprendizado fisiológico e pela memória e o córtex pré-frontal é responsável pelo controle das demais regiões do cérebro e pelo controle das emoções, cujas atividades estão prejudicadas em pacientes com doença de Parkinson. Dessa forma, evidenciamos no presente estudo diante do resultado encontrado que o ESAC pode melhorar a memória, além de funções cognitivas dos pacientes com doença de Parkinson.

A redução de estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA pelo tratamento dos animais com ESAC (v.o) foi importante e que associados aos efeitos neuroprotetores determinados através do estudo comportamental, concede a esse extrato um diferencial em relação a L-DOPA, pois, a L-DOPA tem efeito apenas na reposição de dopamina e não diminui a progressão da doença que está relacionada com aumento do estresse oxidativo.

Durante o estudo preliminar de avaliação do efeito neuroprotetor do ESAC foi investigado possível toxicidade desse através da análise bioquímica do sangue. Observamos que o ESAC, bem como a 6-OHDA não alteraram significativamente os parâmetros bioquímicos investigados como glicose, colesterol total, ureia, creatinina, TGO, TGP e fosfatase alcalina, além de não ser observado alterações nos parâmetros de eletrólitos (cálcio, magnésio, fósforo, sódio e potássio), destaca-se que nos animais tratados com ESAC não houve alteração de transaminase oxalacética e glutâmica que avaliam função hepática e cardíaca, esse dado é interessante considerando que a literatura mostra que a cumarina nos roedores sofre uma metabolização hepática, transformando em 3,4-epóxido cumarina que é hepatotóxica, dessa forma a concentração de cumarina presente no ESAC não foi suficiente para comprometer a segurança desse extrato ou os constituintes ali presentes estão colaborando para que isso não aconteça.

Estudos anteriores realizados por Leal e colaboradores (2003a) com o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *A. cearensis* silvestre (500 mg/Kg, v.o) mostrou ausência de toxicidade frente aos parâmetros investigados, como bioquímicos, hematológicos e reprodutivos em ratos.

De forma generalizada, nossos resultados mostraram que o ESAC apresenta efeito antineuroinflamatório em células neuronais (linhagem PC-12), que parece estar relacionado com a diminuição da produção de mediadores inflamatórios de células microgliciais (linhagem BV-2) estimuladas com LPS, efeito esse que pode explicar em parte como o ESAC em modelo animal de DP melhora os déficits comportamentais, cujo efeito foi comparável ou superior ao exercido pela L-DOPA, além de demonstrar atividade antioxidante.

## 8- CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou de maneira inédita, o efeito anti-inflamatório e/ou antioxidante promissor do ESAC e seus ativos (CM, AMB) em células imunes do SNC, através de sua ação sobre a micróglia (linhagem BV-2) em processo inflamatório estimulado por LPS. Podemos destacar ainda no presente estudo, que o efeito anti-inflamatório exercido pelo ESAC parece estar associado à supressão da via das MAPKs (ERK 1/2 e JNK), além disso, demonstramos o efeito neuroprotetor do ESAC no déficit motor induzido por 6-OHDA em ensaio preliminar *in vivo*. Ademais, a investigação do efeito anti-inflamatório exercido pelo ESAC e ativos (CM e AMB) deve ser melhor compreendido, por meio do estudo de mecanismos moleculares que busquem elucidar como essas drogas agem na diminuição da neuroinflamação mediada por micróglia ativada. Além disso, deverá ser realizada uma investigação mais aprofundada em modelo de doença de Parkinson para o entendimento de como o ESAC age ao exercer efeito neuroprotetor e antioxidante.

## 9- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo com ESAC e ativos (CM, AV e AMB) demonstraram que:

- O ESAC e seus ativos exerceram um efeito sequestrador de radicais livres.
- Este estudo mostra que o ESAC e seus ativos (CM, AMB) têm atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante através da redução da ativação microglial induzida por LPS, diminuindo a expressão de iNOS, a produção de NO, bem como outros mediadores inflamatórios liberados pelas células BV-2, como citocinas pró-inflamatórias.
- O AMB apresenta efeito imunomodulador ao aumentar a atividade da arginase.
- Podemos destacar ainda que o efeito anti-inflamatório na micróglia parece interferir nos mecanismos moleculares de ativação de células microgliais especificamente nas proteínas de sinalização intracelulares MAPKs (ERK1/2 e JNK) que resulta no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e EROs.
- Este trabalho demonstrou também que o ESAC tem um efeito antineuroinflamatório nas células PC-12 possivelmente através da redução da

ativação de células micrógliais.

- No estudo *in vivo*, o ESAC apresentou um efeito neuroprotetor que parece estar relacionada as atividades anti-inflamatória e antioxidante e que esse efeito se deve a presença de CM, AMB e AV, sem deixar de considerar a importância de outros constituintes químicos presentes na planta.
- O efeito antioxidante e neuroprotetor do ESAC foi visto particularmente no estriado, região primariamente afetada na doença de Parkinson, vimos que o ESAC diminuiu o estresse oxidativo, associado a uma melhora comportamental, um efeito que não foi observado com a droga padrão L-DOPA para tratamento da doença de Parkinson, reforçando a ideia de que o ESAC e seus constituintes podem de fato estar alterando o curso da progressão da doença.
- O extrato seco da *Amburana cearensis* e seus constituintes químicos, principalmente amburosídio A e cumarina, são promissores para serem usados como uma nova abordagem terapêuticas, porém, mais estudos são necessários.
- Moléculas como AMB que tem mostrado até o momento um perfil de molécula líder, poderá ser empregada como protótipo para síntese de fármacos mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

- ABATE, W.; A. A. ALGHAITHY, A. A.; PARTON, J.; JONES, J. K. P.; JACKSON, S.K. Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting translocation of TLR4 into lipid raft domains. **Journal of lipid research**, v. 51, p. 334–344, 2010.
- ABDEL-MALAK, F. F.; ISSA, U. H.; MIKY, Y. H. OSMAN, E. A. Applying decision-making techniques to Civil Engineering Projects. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, p. 326-331, 2017.
- ALIREZAEI, M.; KHOSHDEL, Z.; DEZFOULIAN, O.; RASHIDIPOUR, M.; TAGHADOSI, V. Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 65, p. 243-252, 2015.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SIQUEIRA, J. S.; SANTOS, M. R. V.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; QUINTANA, L. J. J. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, p. 1-8, 2010.
- 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.
- 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.
- AYOKA, T. O.; EZEMA, B.O.; EZE, C.N. Nnadi, C.O. Antioxidants for the Prevention and Treatment of Noncommunicable Diseases. **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, v.7, p. 178-188, 2022.
- BALTAZAR, D. H.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VOLLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurology**, v. 32, p. 533-539, 2017.
- BACHILLER, S.; JIMÉNEZ-FERRER, I.; PAULUS, A.; YANG, Y.; SWANBERG, M.; TOMAS DEIERBORG, T.; BOZA-SERRAN, A. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 1–17, 2018.
- BARBOSA, E. R.; SALLEM, F. A. S. Doença de Parkinson. **Revista de Neurociências**, v.13, p. 158-165. 2005.
- BEVINS, R. A.; BESHEER J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols**, v. 2006, p. 1306-1311, 2006.
- BLASIL, E.; BARLUZI, R.; BOCCHINI, V.; MAZOLLA, R.; BISTONI, F. Immortalization

of murine microglia cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **Journal Neuroimmunology**, v. 27, p. 229-237, v. 27, 1990.

Brasil 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004. [Links]

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.

CALOU, I. B. F. Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunohistoquímicos de *Myracodroun Urundeuva* Fr. *All* em modelo experimental de doença de parkinson. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia-UFC, 2013.

CALABRESI, P.; CASTRIOTO, A.; DI FILIPPO, M.; PICCONI, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 12, p. 811-821, 2013.

CARRILLO, J. L. M. CORONADO, O. G. GARCÍA, M. A.M. CORDERO, J. F. C. Physiology and Pathology of Innate Immune Response Against Pathogens. **Physiology and Pathology of Immunology**, v. 2017, p. 100-134, 2017.

CARVALHO, M. B.; FERNANDES, A. C.; MELIBEU, A. C. F.; SERFATY, C. A.; COSTA, P. C. Neuroinflamação e neuroplasticidade na doença de Parkinson: aspectos fisiopatológicos e modelos animais. **Neurociências**, v. 12, p. 45-60, 2016.

CEZARIO, N. A. Associação de diosmina e hesperidina em modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2017.

CECÍLIO, C. A.; COSTA, E. H.; SIMIONI, P. U.; GABRIEL, D. L.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 671-681.

CHAO, D. C.; D. S. X.; HU, EHRLICH, L.; PETERSON, P. K. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically mediate neurotoxicity: Involvement of nitric oxide and of n-methyl-d-aspartate receptors. **Brain Behavior and Immunity**, v. 9, p. 355-365, 1995.

CHIU, C. C.; LIAO, Y. E.; YANG, L. Y.; WANG, J. Y.; TWEEDIE, D.; KARNATI, H. K.; GREIG, N. H.; WANG, J. Y. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. **Journal of Neuroscience Methods**, p. 38-49, v. 272, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 3670-3595, 2013.

COLLIN, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.

- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. v. 420, p. 885-891, 2002.
- CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, **Journal of Immunological Methods**, v. 174, p. 231–235, 1994.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A. Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats & Mice J. Am. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 6, 1957.
- DANG, Y.; XU, Y.; WU, W.; LI, W.; SUN, Y.; YANG, J.; ZHU, Y.; ZHANG, C. A tetrandrina suprime a ativação microglial induzida por lipopolissacarídeos, inibindo as vias de sinalização de NF- $\kappa$ B e ERK em células BV-2. **Plos One**, v. 9, p. 1-10, 2014.
- 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.
- DRUI, G.; CARNICELLA, S.; CARCENAC, C.; FAVIER, M.; A BERTRAND, A.; S BOULET, S.; SAVASTA, M. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. **Nature Publish Group**, v.19, p. 358-67, 2014.
- ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neuroepidemiology**, v. 172, p.14-26, 2015.
- FEBRAFARMA. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acessada em agosto de 2007. [Links]
- FIRPO, HELENA M. Fitoterápicos Buscam Novas Opções. *Revista Guia de Farmácia*, São Paulo, v. 23, 2015.
- 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.
- GAO, F.; CHEN, D.; HU, Q.; WANG, G. Rotenone Directly Induces BV-2 Cell Activation via the p38 MAPK Pathway. **National Library of Medicine**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- GANDHI, K. R.; SAADABADI, A. Levodopa (L-DOPA), StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL), 2022.
- FROTA, A. F. Cimicifuga racemosa: Uma nova perspectiva para o tratamento de distúrbios neurológicos. Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 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.



GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER P. L.; WISHNOK J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HAN, Q.; LIU, S.; LI, Z.; HU, F; ZHANG, Q.; ZHOU, M.; CHEN, J.; LEI, T.; ZHANG, H. DCPIB, a potent volume-regulated anion channel antagonist, attenuates microglia-mediated inflammatory response and neuronal injury following focal cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 15, p.176-185, 2014.

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.

HAN, Q.; LIU, S.; LI, Z.; HU, F; ZHANG, Q.; ZHOU, M.; CHEN, J.; LEI, T.; ZHANG, H. DCPIB, a potent volume-regulated anion channel antagonist, Attenuates microglia-mediated inflammatory response and neuronal injury following focal cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 15, p.176-185, 2014.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, p. 385–403, v. 18, 1934.

HSIAO, Y. T.; YI, P. L.; LI, C. L.; CHANG, F. C. Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 373-384, 2012.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.RH. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTEZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, p. 641-656, 2000.

HEINBOCKEL, L.; WEINDL, G.; TEJADA, G. M.; CORREA, W.; GOMEZ, S. S.; VALERA, S. B.; GOLDMANN, T.; GARIDEL, P.; GUTSMANN, T.; BRANDENBURG, K. Inhibition of lipopolysaccharide- and lipoprotein-induced inflammation by antitoxin peptide Pep19-2.5, **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–6, 2018.

HUNG, M. L. D.; RIVERA, A. Y.; ZIMBRÓN, L. F. H.; SUÁREZ, S. O.; FUENTES, J. L. R. GARCÍAB, A. D.; MARTÍNEZ, R. L.; LEZCANO, L. B. FUENTES, N. P.; PEDRE, L. L. Transient glutathione depletion in the substantia nigra compacta is associated with neuroinflammation in rats. **Neuroscience**, v. 335, p. 207-220, 2016.

HO, Y. J; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. On functionals of linear processes with estimated parameters. **Behav Brain Research**, v. 12, p. 136, 2002.

HO, S. C.; CHANG, S. K.; CHANG, P. W. “Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components. **Food chemistry**, v. 138, p. 2275–2282, 2013.

HODGSON, E. K.; FRIDOVICH, I. The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 430, p. 182–188, 1976.

- HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013.
- IMAI, K.; VENDEROVA, D. S. PARK, H. CAI, E. SCHMIDT. Animal Models of Parkinson's Disease. **Johns Hopkins university**, v. 2011, p. 1-3, 2011.
- JIANG, T.; SUN, Q.; CHEN, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 2016, p. 1-76, 2016.
- JANCOVI, J.; AGUILAR, L. G.; Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. **Neuropsychiatr Disease and Treatment**, v. 4, p. 743-57, 2008.
- KIM, H. G.; PARK, G.; PIAO, Y.; KANG, M. S.; PAK, Y. K.; HONG, S. P.; OH, M. S. Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 293- 300, 2014.
- KIM, J. H.; LEE, H. W.; HWANG, J.; KIM, J.; LEE, M. J.; HAN, H. S.; LEE, W. H. K. Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 2145–2159, 2012.
- MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. 3º edição., edições UFC, Fortaleza, 1998.
- MATOS, F. J. A. Plantas medicinais - Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil, 2º edição: imprensa universitária da UFC, Fortaleza.
- KAUR, S.; SHARMA, N.; NEHRU, B. Anti-inflammatory effects of Ginkgo biloba extract against trimethyltin-induced hippocampal neuronal injury. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 87-104, 2018.
- KABUTO, H.; YAMANUSHI, T. T. Effects of Zingerone [4-(4-Hydroxy-3 Methoxyphenyl)-2-Butanone] and Eugenol [2-Methoxy-4-(2-Propenyl)Phenol] on the Pathological Progress in the 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson's Disease Mouse Model. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 44–49, 2011.
- KIM, M.; LI, Y. X.; DEWAPRIYA, P.; RYU, B.; KIM, S. K. Floridoside suprime respostas pró-inflamatórias, bloqueando a sinalização MAPK na microglia ativada. **BMB Reports**, v. 46 p.398-403, 2013.
- KIM, H. G.; PARK. G.; PIAO, Y.; KANK, M. S. Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 293–300, 2014.
- KIENZL, E.; JELLINGER, K.; STACHELBERGER, H.; LINERT, W. Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease? **Life Sciences**, v. 65, p. 1973–1976, 1999.
- KUMAR, A.; CHEN, S. H.; KADIISKA, M. B. HONG, J. S.; ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B.; MASON, R P. Inducible nitric oxide synthase is key to

peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV-2 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 51-59, 2014.

KWON, H. S.; KOH, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, p. 42, 2020.

LAM, M. M. W.; MAPLETOFT, J. P.; MILLER, M. S. Abnormal regulation of the antiviral response in neurological/ neurodegenerative diseases. **Cytokine**, v. 88, p. 251-258, 2016.

LABZIN, L. I.; HENEKA, M. T.; LATZ, E. Innate Immunity and Neurodegeneration. **Annual Review of Medicine**, v. 69, p. 11-17, 2013.

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 423-453, 1999.

LEAL, L.K.A.M.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; CUNHA, G. M. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRAE. R.; CANUTO, K. M.; VIANA. G. S. B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity, **Neuroscience Letters**, v. 388, p. 86-90, 2005.

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.; FONSECA, F.; PEREIRA, F.; CANUTO, K. M.; FELIPE, C.; FONTENELE, J.; PITOMBEIRA, M.; SILVEIRA, E. R.; VIANA G. S. B. Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. **Planta Médica**, v. 74, p. 497-502, 2008.

LEAL, L. K. A.M. L.; CANUTO, K. M.; COSTA, K. C. S.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; VASCONCELOS, S. M.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, M. V. P. FONTENELE, J. B.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Effects of amburoside a and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils, **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, p. 198–205, 2009.

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.

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.

LEITÃO, K. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato seco padronizado (HPLCPDA) de *Amburana cearensis* – Cumaru. Monografia - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?, **Nature Reviews Neurology**, v. 17, p. 157–172, 2021.

LIU, M.; BING, G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. **Parkinsons Disease**, p. 1-7, v. 2011, 2011.

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.

LIMONGI, J. C. P. Principais sintomas, causas e formas clínicas: Conhecendo melhor a doença de Parkinson: Uma abordagem multidisciplinar com orientações práticas para o dia-a-dia. São Paulo, SP: Plexus, p. 13-35, 2001.

LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10), **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 215, 2018.

LUCETTI, E. C. P. Efeitos centrais da cumarina (1,2-benzopirona): estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2010.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Experimentação animal**, v. 80, p. 33-36, 2008.

MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v.7, p. 801–820, 2015.

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.

MOTTA, E. V. S.; PINTO, N. C. C.; DUQUE, A. P. N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Mucuna pruriens*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, p. 264-272, 2013.

MAHAJAN, N, A.; BALAKRISHNAN, P.; PATEL, A.; KONSTANTINIDIS, I.; NISTAL, D.; ANNAPUREDDY, N.; POOJARY, P.; NADKARNI, G. N.; SIDIROPOULOS, C. Epidemiology of inpatient stay in Parkinson's disease in the United States: Insights from the Nationwide Inpatient Sample. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 31, p. 162–165, 2016.

MELO, A.; MONTEIRO, L.; LIMA, R.; OLIVEIRA, D. M.; CERQUEIRA, M.D.; BACHÁ, R.S. Estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas: mecanismos e perspectivas terapêuticas. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

MILLS, D.; L. L.; LENZ, L. L.; LEY, A. K. Macrophages at the fork in the road to health or 9- Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–7, 2015.

MOHD SAIRAZI, N. S.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 5–7, 2020.

MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. **International Journal of Cancer**, v. 20, 2007.

MUZIO, L.; VIOTTI, A.; MARTINO, G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 2021.

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, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOURMOHAMMADI, S. YOUSSEFI, S.; MANOUCHEHRABADI, M.; FARHADI, M.; AZIZI, Z. Torkaman-Boutorabi, A. Timol protege contra neurotoxicidade induzida por 6-hidroxi-dopamina em modelo *in vivo* e *in vitro* da doença de Parkinson através da inibição do estresse oxidativo. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22 p. 1-14, 2022.

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.

PORSOLT, R. D.; LE PICHO, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p.730-732, 1977.

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils - a diagnostic aid. **Lancet**. v.7, p. 532-4, 1968.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press, New York**, 1986.

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.

PEREIRA, E. C.; SOUZA, C.; NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; FERNANDEZ, L. G. *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 157–166, 2017.

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.

PINTO, B. N.; ALEXANDRE, B. S.; NEVES, K. R. T.; SILVA, A. H.; LEAL, K. A. M.; VIANA, G. S. B. Propriedades neuroprotetoras do extrato padronizado de *Camellia sinensis* (chá verde) e seus principais componentes bioativos, epicatequina e galato de epigallocatequina, no modelo 6-OHDA da doença de Parkinson. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

PRINGSHEIM, T.; NATHALIE JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. L. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement disorders**, v. 29, p. 1583-1590, 2014.

RAMOS, K. M. O. *et al.* Desenvolvimento inicial e repartição de biomassa de *Amburana cearensis* (Allemao) A. C. Smith, em diferentes condições de sombreamento. **Acta botanica brasílica.**, v. 18, p. 351-358, 2004.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Farmacologia, 8ª edição, editora ELSEVIER, 2015.

RANSOHOFF, R. M. “How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, p. 777–783, 2016.

RATH, M.; MÜLLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Metabolism via arginase or nitricoxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages, **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–11, 2014.

REGENSBURGER, M.; PROTS, I.; WINNER, B. Adult hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: impact on neuronal survival and plasticity. **Neural Plasticity**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

RYAN, J. Introduction to animal cell culture. Technical bulletin. Corning life sciences. 2008 [Online] [Citação: 2 setembro de 2011].  
[http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro\\_animal\\_cell\\_culture.pdf](http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf).

SANTOS, G. F.; SILVA, G. Q. M.; MOREIRA, D. R.; Vergutz, B. G. CARVALHO, J. P. M.; PESSOA, J. P. A.; JUNIOR, V. P. N.; TAFURI, N. F. Parkinson's Disease: Epidemiological pattern of hospital admission Enfermedad de Parkinson: Patrón epidemiológico de admisiones em Brasil. **Research Society and Development**, v.11, p. 1-9, 2022.

ROSA, M.M.; AMORIM L.C.; ALVES, J. V.O.; AGIAR, I. F. S.; OLIVEIRA, F. G. S.; SILVA, M. V.; SANTOS, M. T. C. The promising role of natural products in Alzheimer's disease. **Brain Disorders**, V. 2022, p. 1-14, 2022.

SILVA, A. B. G.; PESTANA, B. C.; HIRAHATA, F. B. S.; OLIVEIRA, E. S. B. O. Parkinson's disease: Literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 47677-47698, 2021.

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.;

COSTA, S. L. Amburana cearensis: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds. **Molecules**, v. 25, p. 1–16, 2020.

SONGE, J.; KIM, J. Degeneração de neurônios dopaminérgicos devido a alterações metabólicas e doença de Parkinson. **Frontiers Aging in neuroscience**, v. 8, p 1-11, 2016.

STEIDL, E. M. S.; ZIEGLER, J.R.; FERREIRA, F. V. Doença de Parkinson: revisão bibliográfica. **Disciplinarum scientia**, v. 8, p. 115-129, 2007.

SMITH, C. M. L.; SULLIVAN, A. M.; NOLAN, Y. M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 89, p. 277–287, 2009.

SCHALLER, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.; BLAND, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 777-787, 2000.

SHALAVADI, M. H.; CHANDRASHEKHAR, V. M.; AVINASH, S.P.; SOWMYA, C.; RAMKISHAN, A. Atividade neuroprotetora de *Stereospermum suaveolens* DC contra modelo de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA. **Indian Journal Phamacology**, v. 44, p. 737-743, 2012.

SHARMA, N.; NEHRU, B. Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. **Neurochemistry International**, v. 87, p. 92-105, 2015.

SOUSA, A. A.; BRAGA, S. A.; SOBRINHO, H. M. R. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 43, p. 79-89, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1ª edição, **Artmed Editora**, 2016.

STANSLEY, B.; POST, J.; HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 2- 8, 2012.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 106, p. 17-32, 2013.

TATEM, T. K. S.; JAMES L. QUINN, J. L.; PHADKE, A.; YU, Q.; GORDISH-DRESSMAN, H.; NAGARAJU, K. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases, **Journal of visualized Expiement**, v. 29, p. 2-7, 2014.

THARMALINGAM, S.; ALHASAWI, A.; APPANNA, V. P.; LEMIRE, J.; APPANNA, V. D. Reactive Nitrogen Species (RNS)-resistant microbes: Adaptation and medical implications. **Biological Chemistry**, v. 398, p. 1193–1208, 2017.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; PAOLO ZAMBONI, P.; R.T MAHAJAN, R. T. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacol**, v. 7, p. 65-74, 2009.

VASCONCELOS, F. M. Eugenol protege contra a progressão dos danos neurodegenerativos em ratos hemiparkinsonianos. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

VILELA, B. Artigo: Em 2030, mais de 600 mil brasileiros poderão sofrer do Mal de Parkinson, acessado em 10/01/2022.

VISANJI, N. P.; BROTCHE, J. M.; KALIA, L. V.; KOPRICH, J. B.; TANDON, A.; WATTS, J. C.; LANG, A. E.  $\alpha$ -Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era, **Trends in Neurosciences**, v. 20, p.1-13, 2016.

VARNUM, M. M.; IKEZU, T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. **HHS Public Access Author manuscript**, v. 60, p. 251-266, 2012.

WANG, T. F; WU, S. Y; PAN, B. S.; TSAI, S.F.; KUO, Y. M. Inhibition of Nigral Microglial Activation Reduces Age-Related Loss of Dopaminergic Neurons and Motor Deficits. **Cells**, v.3, p. 1-19, 2022

YANG, Y.; DENG, J. Analysis of pharmaceutical products and herbal medicines using ambient mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 68–88, 2016.

YEO, E. T. Y.; WONG, K. W. L.; SEE, M. L.; WONG, K. Y.; GAN, S. Y.; CHAN, E. W. L. Piper sarmentosum Roxb. confers neuroprotection on beta-amyloid (A $\beta$ )-induced microglia-mediated neuroinflammation and attenuates tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 187–194, 2018.

YU, L. Z.; TANG, L.; CHEN, J. L.; WU, W.; HU, C. Capillarisin Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Mediators in BV2 Microglial Cells by Suppressing TLR4-Mediated NF- $\kappa$ B and MAPKs Signaling Pathway, **Neurochemical Research**, v. 40, p. 1095–1101, 2015.

YUSTE, J. E.; ERNESTO TARRAGON, E.; CAMPUZANO, C. M.; BERNAL, F. R. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 1-13, 2015.

ZHAO, C. H.; DONG, J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.; LIN, Y.; FAN, W.; GU, G. Effects of Extraction Solvent Mixtures on Antioxidant Activity Evaluation and Their Extraction Capacity and Selectivity for Free Phenolic Compounds in Barley ( *Hordeum vulgare* L.),” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7277-7286, 2006.

ZHAO, Z.; TAO, L.; LIU, A.; MA, M.; LI, H.; ZHAO, H.; YANG, J.; WANG, S.; JIN, Y.; SHAO, X.; BAO, F. NF- $\kappa$ B is a key modulator in the signaling pathway of *Borrelia burgdorferi* BmpA-induced inflammatory chemokines in murine microglia BV2 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, p. 4953-4958, 2018.



ZHANG, X.; Wang, D.; LI, C.; JIN, X.; WU, Y. Effects of M2 Polarization of Microglia on Inflammatory Injury in Cerebral Hemorrhage. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, v.6, p.1-8, 2020.




ZHOU, H. F. LIU, X. Y. NIU, D. B. LI, F. Q. HE, Q. H. WANG, X. M. Triptolide protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage induced by lipopolysaccharide intranigral injection. *Neurobiology of Disease*, v. 18, p. 441-449, 2005.

ZHU, X.; OWEN, J. S.; WILSON, M. D.; LI, H.; GRIFFITHS, G. L.; THOMAS, M. J.; HILTBOLD, E. M. FESSLER, M. B.; PARKS, J. S. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *Journal of Lipid Research*, v. 51, p. 3196-3206, 2010.

ZUANAZZI, J.A; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química nova*, v. 33, p. 1421-1428, 2010.

## Research Article

# 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

Ana Bruna de Araújo <sup>1</sup>, Francisco Vinicius Clemente Serra Azul,<sup>1</sup>  
 Francisca Raysse Mesquita Silva,<sup>1</sup> Talysson Silva de Almeida,<sup>1</sup> João Victor Nunes Oliveira,<sup>1</sup>  
 Antônia Torres Ávila Pimenta,<sup>1</sup> Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra,<sup>1</sup> Nuno J. Machado <sup>1,2</sup>  
 and Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal <sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

<sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brazil*

Correspondence should be addressed to Nuno J. Machado; [nuno.machado.br@gmail.com](mailto:nuno.machado.br@gmail.com) and Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal; [kalyne@ufc.br](mailto:kalyne@ufc.br)

Received 10 February 2022; Accepted 21 March 2022; Published 28 April 2022

Academic Editor: Abdur Rauf

Copyright © 2022 Ana Bruna de Araújo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Microglia plays an important role in the neuroinflammatory response, identified as one of the major factors in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Amburana cearensis* and its bioactive compounds, including coumarin (CM), vanillic acid (VA), and amburoside A (AMB), exert antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective activities, on 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells determined by our group. The present study investigated the anti-inflammatory effect of the dry extract from *A. cearensis* (DEAC), CM, AMB, and VA on lipopolysaccharide- (LPS-) stimulated microglial cells and elucidated the possible molecular mechanism of action. The DEAC was characterized by HPLC-PDA (chemical markers: CM, AMB, and VA). The BV-2 microglial cell line was pretreated with increasing concentrations of DEAC, CM, AMB, or VA in the presence or absence of LPS to evaluate the toxicity and anti-inflammatory activity. The cytotoxicity of DEAC, CM, AMB, or VA on BV-2 cells was evaluated by the MTT test, the free radical scavenging activity of test drugs was investigated, and the nitric oxide (NO) production was determined using the Griess reagent, while cytokine levels were measured by ELISA. The expressions of toll-like receptor 4 (TLR-4), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), MAPK members (JNK and ERK1/2), and iNOS were determined through Western blot analysis. DEAC, CM, AMB, or VA (5–100  $\mu$ g/mL) did not induce any detectable cytotoxicity in BV-2 cells. All test drugs (100  $\mu$ g/mL) showed free radical scavenging activity (hydroxyl and superoxide radicals); however, only DEAC, CM, and AMB (5–100  $\mu$ g/mL) significantly reduced NO production. DEAC (100  $\mu$ g/mL), as well as CM (50 and 100  $\mu$ g/mL) and AMB (25  $\mu$ g/mL), reduced at least 50% of NO produced and markedly decrease the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 but they did not significantly affect IL-10 levels. Only DEAC (100  $\mu$ g/mL) and AMB (25  $\mu$ g/mL) reduced the expression of iNOS, and they did not affect arginase activity. DEAC (100  $\mu$ g/mL) suppressed the activation of the MAPKs JNK and ERK1/2 in LPS-activated BV-2 cells but it did not suppress the expression of TLR-4 nor the phosphorylation of NF- $\kappa$ B. In conclusion, DEAC, CM, and AMB exerted anti-inflammatory activity in LPS-activated microglial cells as observed by the reduction in the production of inflammatory mediators and the expression of iNOS. We identified the MAPK signaling pathway as a probable mechanism of action to the anti-inflammatory effects observed.

## 1. Introduction

There is increasing evidence of the important role of neuroinflammation in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease [1–3]. The neuroinflammatory process includes a variety of events marked by the accumulation of various proinflammatory mediators, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), prostaglandins, nitric oxide (NO) (generated by inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reactive oxygen species (ROS)). Microglia and astrocytes are the innate immune cells primarily involved in these proinflammatory mechanisms which cause damage to neuronal networks. In parallel, under physiological conditions, these cells have a protective function in preserving the homeostasis of the central nervous system (CNS) by secreting anti-inflammatory mediators and neurotrophic factors, such as transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 10 (IL-10), and arginase-1 [3, 4]. Thus, controlling microglial activation or modulating its phenotypes in response to damage-associated stimuli may be a promising strategy in the development of a therapy for neuroinflammatory diseases.

Microglial cells can be activated by various endogenous and environmental stimuli such as IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), glutamate, arachidonate, and lipopolysaccharide (LPS). LPS is found on the outer membrane of Gram-negative bacteria, acting as an endotoxin that binds to specific receptors, and it has been widely used to study inflammation due to its reproducible action and easy handling [5]. LPS induces activation of the toll-like receptor 4 (TLR-4) which activates nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) that play critical roles in the production of inflammatory mediators [6, 7].

Due to a deficit in therapeutical options, herbal products have been the focus of several studies for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases [8, 9]. *Amburana cearensis* A. C. Smith (Fabaceae), a plant native to the Brazilian semiarid region, has been extensively studied by our group that determined its chemical profile and pharmacological properties [10–13]. Other previous studies developed by our group [10, 14–18] allowed us to determine the anti-inflammatory and antioxidant activities of the extract of *A. cearensis* (wild or cultivated) and/or its chemical constituents, such as coumarin (CM), amburoside A (AMB, phenol glucoside), and vanillic acid (VA, phenol acid). Outside the brain, they exert anti-inflammatory activity mainly by inhibiting the accumulation and activation of polymorphonuclear cells and the production of cytokines and ROS. Additionally, in rat mesencephalic cell cultures exposed to 6-hydroxydopamine (6-OHDA), Leal and colleagues [15] showed that AMB reduced the damage caused by this neurotoxin through the inhibition of the increase in lipidic peroxidation and production of nitrite. These data suggest that this phenol glucoside, among the main chemical constituents of *A. cearensis*, could provide benefits as a therapeutic agent in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Therefore, the present study was designed to evaluate the anti-inflammatory effects of a standardized dry extract

of *A. cearensis* and its chemical constituents (CM, AMB, and VA) in LPS-stimulated microglial cells. Moreover, it is aimed at contributing to the elucidation of the mechanisms of action involved by evaluating the role of the signaling pathways of TLR-4, NF- $\kappa$ B, and MAPKs.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Preparation and Chemical Characterization of Dried Extract from *Amburana cearensis* Extract (DEAC).** To achieve a sustainable alternative for economic utilization of *A. cearensis*, in the last years, our research group became focused also on *A. cearensis* cultivated plant which has chemical and biological properties similar to the wild variety [16]. Seeds of *A. cearensis* were collected at the Quixeramobim region, Ceará State, Brazil, and voucher specimen (n° 52618) was deposited in the herbarium Prisco Bezerra, Department of Biology, Federal University of Ceará. *A. cearensis* seeds were cultivated, and seven months later, the plant was harvested from the garden beds, dried, and ground. The extraction was carried out by maceration for 24 h with ethanol as previously determined by our laboratory [17]. The drying process of the ethanol extract was performed at room temperature using a mini spray-dryer model LM MSD 1.0 (Labmaq do Brazil Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The colloidal silicon dioxide was used as drying carrier (30% of the solid residues) with a feed flow of 1 L/h, inlet temperature of 100°C, and airflow of 40 L/min.

**2.2. HPLC-PDA Analysis.** Dried extract of *A. cearensis* (DEAC) was analyzed by high-performance liquid chromatography-photodiode array (HPLC-PDA) (Waters) according to the method developed previously by our laboratory [10]. The analysis of the three chemical markers (coumarin (CM), amburoside A (AMB), and vanillic acid (VA)) was performed through their calibration curves, obtained by injection of external standards. The analysis of DEAC was performed in a C18 reverse phase column (4.6 mm  $\times$  250 mm) at a temperature of 45°C. The mobile phase was composed of acetonitrile (A), 0.01% phosphoric acid (B), and n-propanol (C), flow of 1 mL per minute. Detection was performed in a PDA detector using the wavelengths of 219 nm, 277 nm, and 220 nm for the determination of VA, CM, and AMB, respectively. The HPLC-PDA analysis of the DEAC allowed the identification and quantification of vanillic acid, amburoside, and coumarin.

**2.3. Chemicals and Antibodies.** The amburoside A (AMB) was isolated from *A. cearensis* according to the methodology described previously by our group [18]. Vanillic acid (VA), coumarin (CM), *N*-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), 2-thiobarbituric acid (TBA), nitrotetrazolium blue chloride (NBT), hypoxanthine (HPX) and xanthine oxidase (XOD), phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and L-ascorbic acid (vitamin C) were obtained commercially from Sigma-Aldrich, USA. Sulfanilamide and ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dehydrate

(EDTA) were purchased from Dinâmica Química Contemporânea, Brazil. Trichloroacetic acid (TCA) was acquired from Exodo Científica, Brazil.

Fetal bovine serum (FBS) and cell culture medium RPMI-1640 were purchased from Gibco, USA. Murine microglial (BV-2) cells were acquired from Banco de Células do Rio de Janeiro, Brazil.

The antibodies anti-NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B, JNK, p-JNK, and p-ERK were obtained from Cell Signaling Technologies. TLR-4 antibody was obtained from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Anti-iNOS, ERK,  $\beta$ -actin antibodies, and secondary antibodies (anti-rabbit and anti-mouse) were obtained from Abcam Cambridge, UK. ELISA kits for TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and IL-1 $\beta$  were purchased from BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA.

**2.4. Cell Culture Conditions.** The murine BV-2 cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were grown to 70-80% confluency and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

**2.5. Cell Viability Assay.** Before conducting the anti-inflammatory activity test of the DEAC and its chemical constituents, we performed the cytotoxicity test first in BV-2 cells. The MTT test evaluated BV-2 cells' viability using the method previously described by Mosmann [19]. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were plated in 96-well plates and treated with DEAC, CM, VA, or AMB (5, 10, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL) and 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) (drug vehicle) for 24 h. After the incubation period, the salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL final concentration) was added into the plate, then incubated for 90 minutes at 37°C. At last, the cells were centrifuged at 200 g for 10 minutes, the supernatant discarded, and the formazan crystals dissolved in DMSO. The absorbance of each well was recorded at 570 nm by using a plate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

**2.6. NO Measurement.** The concentration of nitrite in LPS-induced BV-2 cells was determined by the Griess assay [20]. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were plated in 96-well plates and incubated with DEAC, CM, VA, or AMB (5, 10, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL) and 0.1% DMSO (drug vehicle), and 1 h later, LPS (0.5  $\mu$ g/mL) was added. After 24 h, Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED) in distilled water, 1:1) was added to cell medium at room temperature, and 15 minutes later, absorbance at 540 nm was measured on a plate reader. The concentrations of NO were calculated from the standard curve generated by known concentrations of sodium nitrite.

**2.7. Measurement of Hydroxyl Radical.** The hydroxyl radical was measured using the deoxyribose method according to Zhao and colleagues [21] with modifications. Ascorbic acid (1 mM), EDTA (1 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), FeCl<sub>3</sub> (1 mM), and deoxyribose (DOR) (36 mM) were added to a reaction tube with DEAC (100  $\mu$ g/mL), CM (100  $\mu$ g/mL), VA (100  $\mu$ g/

mL), AMB (100  $\mu$ g/mL), or 0.1% DMSO (drug vehicle) in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) and incubated for 1 h at 37°C. TCA 10% and TBA 1% (prepared in NaOH 50 mM) were added, and the solution was heated in a water bath at 85°C for 15 minutes. Absorbance at 532 nm was measured.

**2.8. Assay for Superoxide Radical Scavenging Activity.** Superoxide generation was measured by a slight modification of the previous method described by Hodgson and Fridovich [22] using the hypoxanthine/xanthine oxidase (Sigma-Aldrich, USA) system. Nitrotetrazolium blue chloride (NBT), hypoxanthine (HPX), and xanthine oxidase (XOD) solutions were prepared in Tris buffer. DEAC, CM, VA, or AMB at 100  $\mu$ g/mL, or 0.1% DMSO, were added to the reaction solution containing 0.05 M Tris buffer,  $5 \times 10^{-3}$  M HPX, and  $10^{-3}$  M NBT. Then, 1.67  $\mu$ g/mL XOD was added, except in the negative control. The absorbance was measured at 560 nm every minute for 21 min.

**2.9. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** BV-2 cells were pretreated with DEAC (100  $\mu$ g/mL), AMB (25  $\mu$ g/mL), CM (50 and 100  $\mu$ g/mL), or 0.1% DMSO (drug vehicle) for 1 h, then stimulated with LPS (0.5  $\mu$ g/mL) for 24 h. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10 in the culture supernatant were quantified using commercially available ELISA kits (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader.

**2.10. Western Blot Analysis.** BV-2 microglial cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were pretreated with DEAC (100  $\mu$ g/mL), CM (50, 100  $\mu$ g/mL), AMB (25  $\mu$ g/mL), or 0.1% DMSO (drug vehicle) for 1 h. LPS (0.5  $\mu$ g/mL) was added, and the cells were incubated for 1 h or 24 h. The cells were harvested, and adherent cells were resuspended in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Cellular proteins were extracted by incubating with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) containing protease inhibitor cocktail (1:20), phenylmethylsulfonyl fluoride (1:50), and phosphatase inhibitor cocktail set III (1:20). The cell lysate was centrifuged at 12500  $\times$ g for 10 min at 4°C, and the supernatant was kept as the protein extract. Protein concentration was determined with a BCA kit using bovine serum albumin (BSA) as standard, and the protein concentration of all samples was normalized with Laemmli buffer. Equal amounts of protein (30  $\mu$ g) from each sample were subjected to 7.5-10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After blocking at room temperature with 5% nonfat dry milk or 5% BSA for 1 h, the blocked membranes were incubated for 18 h with primary antibodies against p-NF- $\kappa$ B 1:1000 (#3033S), NF- $\kappa$ B 1:2000 (#6956S), p-ERK1/2 1:1000 (#9101S), ERK1/2 1:1000 (ab36991), p-JNK 1:1000 (#9255S), JNK 1:2000 (#9252S), iNOS 1:1000 (ab178945), TLR-4 1:200 (482300), and  $\beta$ -actin 1:5000 (ab8226) at 4°C. After washing three times with TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), the membranes were incubated with the secondary antibody for 2 h at room temperature. Protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad, USA) in an imaging

system (ChemiDoc MP, Bio-Rad, USA) [23], and the protein levels were analyzed using the ImageLab 6 software (Bio-Rad, USA) and normalized with  $\beta$ -actin or total proteins.

**2.11. Analysis of Arginase Activity.** Arginase activity was evaluated according to the method described by Corraliza et al. [24]. BV-2 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were pretreated with DEAC or CM (100  $\mu$ g/mL) or 0.1% DMSO (drug vehicle), for 1 h before the addition of LPS (0.5  $\mu$ g/mL), or vehicle. After 24 h, cells were lysed with buffer containing 0.1% Triton X-100. The enzyme was activated by heating the plates for 10 minutes at 55°C, using enzyme activation buffer (10 mM  $MnCl_2$ , 25 mM Tris-HCl). The hydrolysis of L-arginine (25  $\mu$ L, 0.5 M, pH 9.7) was induced through the incubation of lysate (50  $\mu$ L) with 25  $\mu$ L of L-arginine (Sigma-Aldrich, USA) 0.5 M (pH 9.7) during 60 min at 37°C. The reaction was stopped with 400  $\mu$ L of buffer containing  $H_2SO_4/H_3PO_4/H_2O$  (1/3/7, v/v/v). After the addition of  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone (25  $\mu$ L, 9%) and heating for 30 minutes at 95°C, the concentration of urea (final product of the reaction) was determined by spectrophotometric analysis (540 nm). The concentrations of urea were interpolated from the linear equation obtained from the standard curve generated by known concentrations of urea (1.5 to 300  $\mu$ g/mL).

**2.12. Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software, Inc.), and all results were expressed in  $\pm$  SEM (standard error of mean). Differences were evaluated by one-way ANOVA or two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test or one-sample *t*-test. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. Standardized DEAC and Its Active Compounds Are Not Toxic to BV-2 Microglial Cells.** The dried extract of *A. cearensis* (DEAC) was characterized by HPLC-PDA as shown in Figure 1(a). The HPLC analysis allowed to detect and quantify three compounds (mg/g of dried extract): vanillic acid ( $2.70 \pm 0.01$  mg/g), amburoside A ( $30.40 \pm 0.01$  mg/g), and coumarin ( $70.07 \pm 0.01$  mg/g). To first evaluate the effect of DEAC and its chemical constituents on cell viability by MTT test, we pretreated BV-2 microglial cells with increasing concentrations of test drugs. As shown in Figure 1(b), the treatment of cells with DEAC, CM, AMB, or VA (5, 10, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL) did not significantly affect the viability of cells when compared to the control group (100% of viability) (see Figure 1).

**3.2. DEAC, CM, and AMB Reduce NO Production in LPS-Stimulated Microglial Cells.** Microglia plays a central role in neuroinflammation being responsible for the synthesis and release of a wide array of chemical mediators including cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ROS, and NO. First, we investigated the effect of DEAC and its active principles (AMB, CM, and VA) on nitrite production of LPS-stimulated microglial cells. The addition of DEAC or its chemical constituents in increasing concentrations did not

alter the basal levels of NO in BV-2 cells (data not shown). LPS increased NO release by approximately 13x (Figure 2) in microglial cells when compared to the untreated group (control group). This effect was significantly reduced by the pretreatment of cells with noncytotoxic concentrations of DEAC, AMB, or CM, reaching maximal reduction at 100  $\mu$ g/mL (nitrite:  $6.1 \pm 1.0$   $\mu$ M,  $4.4 \pm 1.4$   $\mu$ M, and  $7.0 \pm 1.5$   $\mu$ M, respectively). The LPS-only groups released nitrite at the following concentrations:  $13.0 \pm 1.4$   $\mu$ M,  $16.7 \pm 0.2$   $\mu$ M, and  $23.6 \pm 2.8$   $\mu$ M, respectively. AMB in particular showed a significant reduction in the NO production from 25  $\mu$ g/mL. The pretreatment of the BV-2 cells with VA did not significantly interfere in the NO production induced by LPS.

**3.3. DEAC, CM, and AMB Regulate Cytokine Production in LPS-Stimulated Microglial Cells.** Considering the results obtained in the Griess assay, we chose the lowest anti-inflammatory concentration for each drug (DEAC, AMB, and CM) to evaluate their effects on the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (Figures 3(a)–3(i)). The addition of LPS for 24 h induced a significant increase in the TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels while IL-10 levels (anti-inflammatory cytokine) were reduced when compared to the untreated group. Pretreatment of cells with DEAC, AMB, or CM for 1 h before the addition of LPS significantly reduced the concentration of proinflammatory cytokines. On the other hand, the reduction of IL-10 induced by LPS on BV-2 cells was not significantly affected by the tested drugs, although DEAC and AMB increased its concentration by approximately 20.6% and 62.7%, respectively, compared to the LPS group.

**3.4. DEAC, CM, AMB, and VA Have Free Radical Scavenging Activity: Hydroxyl Radical and Superoxide Anion.** An excessive amount of ROS produced by activated microglial cells can lead to cell damage and apoptosis. We investigated the possible oxygen free radical scavenging activity of DEAC and its active principles. DEAC, CM, VA, and AMB showed effective anion superoxide and hydroxyl radical scavenging activity (Figure 4). Superoxide anion scavenging activity of AMB (100  $\mu$ g/mL) was found to be  $77.0 \pm 12.3\%$ , an effect comparable to gallic acid used as a reference compound ( $81.4 \pm 7.1\%$ ). DEAC, CM, and VA exhibited scavenging activity of  $55.2 \pm 10.8\%$ ,  $33.3 \pm 3.3\%$ , and  $43.0 \pm 4.0\%$ , respectively. The scavenging effect of DEAC and its active principles on the hydroxyl radical decreased in the order of DEAC > VA > AMB > CM.

**3.5. Effect of DEAC, AMB, and CM in LPS-Induced iNOS Expression in BV-2 Cells by Western Blot.** Following the study, we investigated whether the suppression of NO production by DEAC, AMB, or CM was related to the expression of its synthase, iNOS. LPS induced a significant increase in the density of iNOS, but this effect was significantly reduced by the pretreatment with DEAC (100  $\mu$ g/mL) or AMB (25  $\mu$ g/mL) (Figure 5). On the other hand, the treatment of BV-2 cells with CM did not affect iNOS

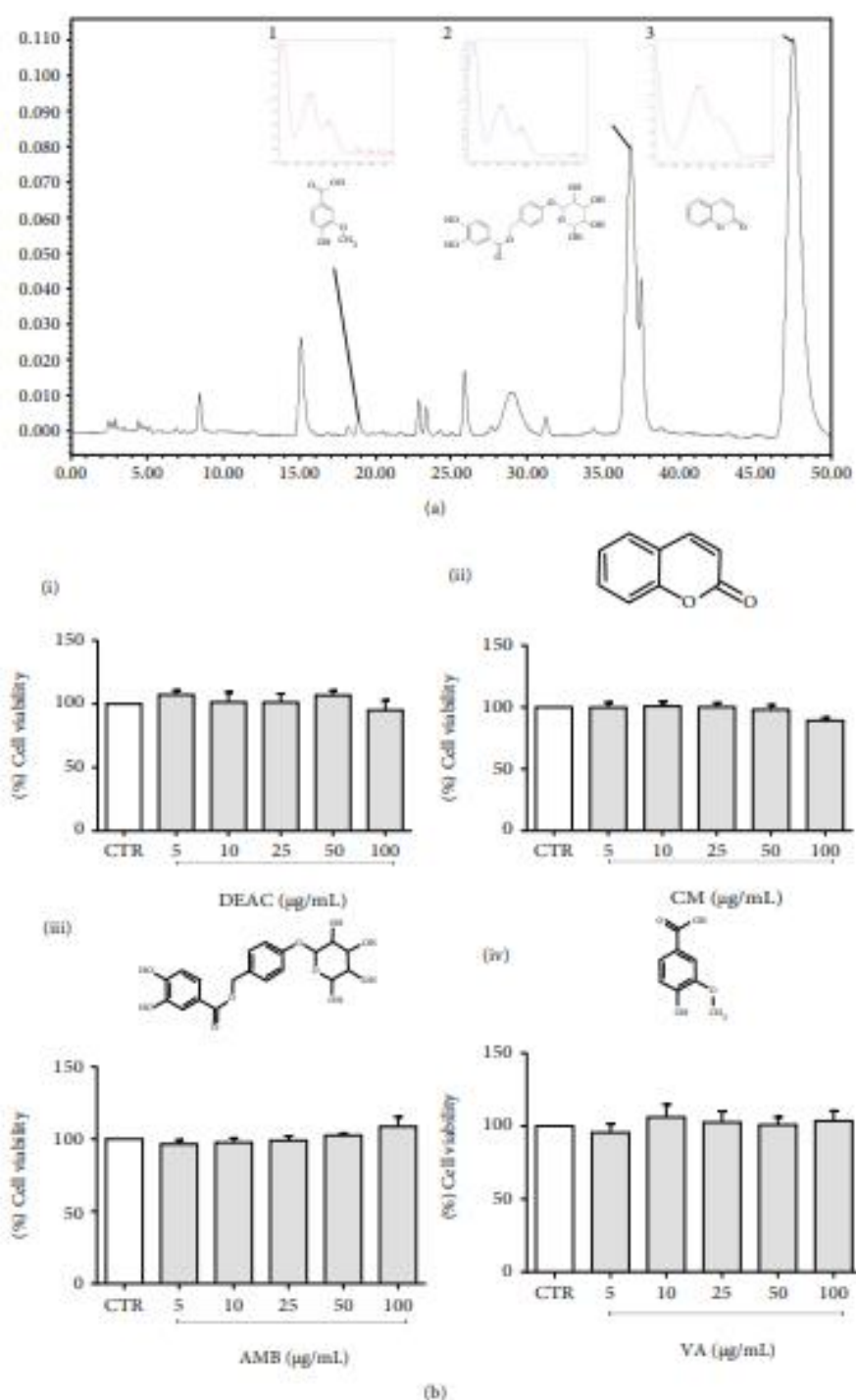


FIGURE 1: Chromatographic profile of dry extract from *A. rearensis* (DEAC) and identification of three compounds (a). Effect of DEAC (i), CM (ii), AMB (iii), and VA (iv) (5–100 µg/mL) in BV-2 cell viability measured through the MTT assay. Data are shown as percentage of controls (CTR; 0.1% DMSO). Results are expressed as the mean ± SEM. ANOVA test followed by the Bonferroni posttest,  $n = 4/\text{group}$ .

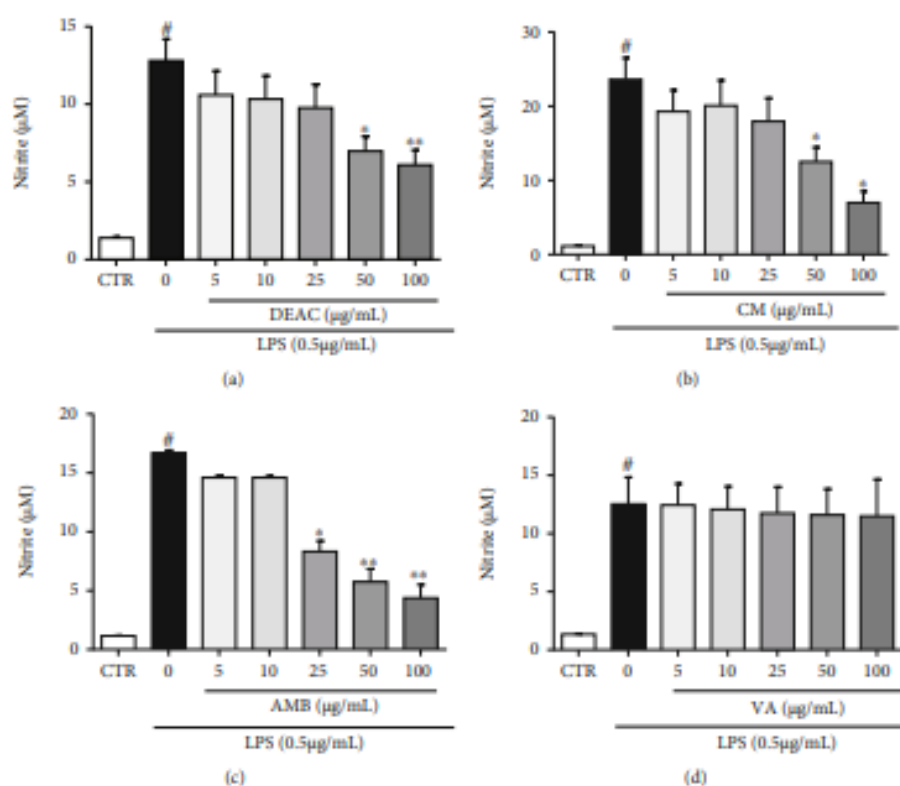


FIGURE 2: Effect of DEAC (a), CM (b), AMB (c), and VA (d) (5–100 µg/mL) in LPS-induced nitrite production. BV-2 cells were pretreated with the drugs for 1 h and incubated with or without LPS (0.5 µg/mL) for 24 h. All values are expressed as mean ± SEM of concentration of nitrite. One-way ANOVA was used followed by the Bonferroni posttest. #vs. control group (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ), \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs. LPS group,  $n = 4$ /group.

expression. In the absence of LPS, DEAC and its active principles did not change the expression of iNOS.

**3.6. DEAC and CM Did Not Prevent the Reduction of Arginase Activity Induced by LPS in BV-2 Cells.** The addition of LPS (0.5 µg/mL) to BV-2 cells significantly reduced arginase activity, measured by the concentration of urea ( $50.5 \pm 7.7$  µg/mL) when compared to the nontreated group ( $87.2 \pm 11.6$  µg/mL). In the absence of LPS, only CM (100 µg/mL:  $10.3 \pm 0.6$  µg/mL), but not DEAC (100 µg/mL:  $93.0 \pm 12.0$  µg/mL), significantly reduced the concentration of urea. None of DEAC or CM was able to prevent the reduction of arginase activity when compared to the LPS group (LPS 0.5 µg/mL), although the DEAC (100 µg/mL:  $58.2 \pm 3.0$  µg/mL) showed a tendency to increase arginase activity by approximately 15.4%.

**3.7. Effects of DEAC in LPS-Induced TLR-4/NF-κB/ERK1/2 and JNK Pathways.** LPS induces an inflammatory response by interacting with the TLR-4 receptor. We first investigated the effect of DEAC on the expression of this receptor in BV-2 cells, followed by the analysis of the phosphorylation of its downstream signaling proteins (NF-κB and MAPKs). West-

ern blotting results showed that the LPS exposure significantly increased the expression of TLR-4 in BV-2 cells when compared to the control group (not the treated group). However, DEAC pretreatment did not significantly prevent this increase (Figure 6(a)). As shown in Figures 6(b) and 6(c), LPS stimulation resulted in the phosphorylation of ERK1/2 and JNK, and DEAC pretreatment significantly decreased the phosphorylation of both MAPKs. Phosphorylation of NF-κB was not changed by DEAC (Figure 6(d)).

#### 4. Discussion

Evidence suggests that exacerbated neuroinflammation response in the central nervous system is decisively related to degenerative processes in several neurological diseases, including multiple sclerosis, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. Moreover, the literature has shown that microglial activation has a key role in the progression of those diseases [25–27]. Therefore, regulating neuroinflammation is a therapeutic goal. The present work sought to investigate the effects of standardized dried extract of *A. cearensis* (DEAC) and its chemical constituents (CM, AMB, and VA) in LPS-induced inflammation in microglial

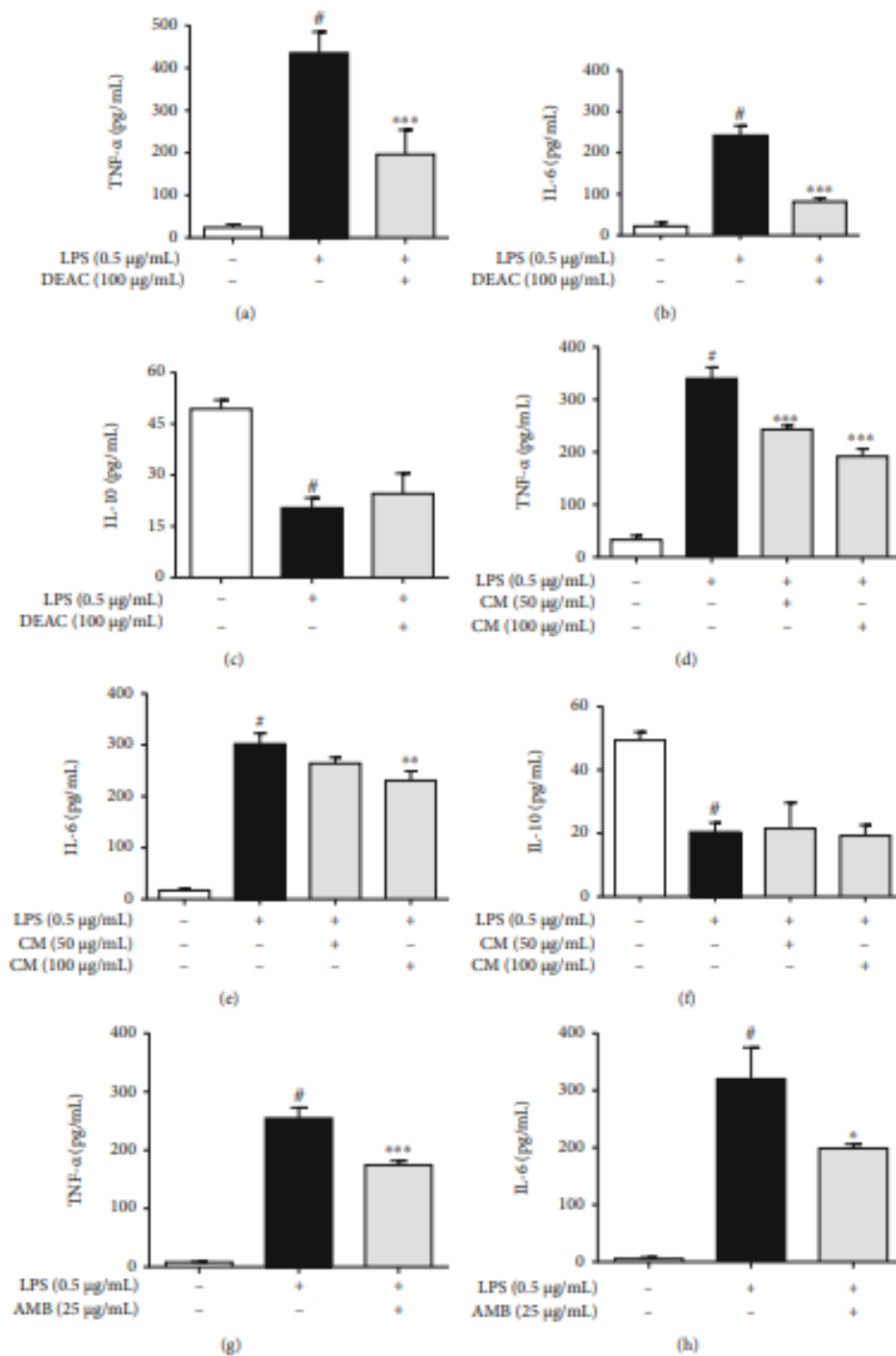


FIGURE 3: CONTINUED.



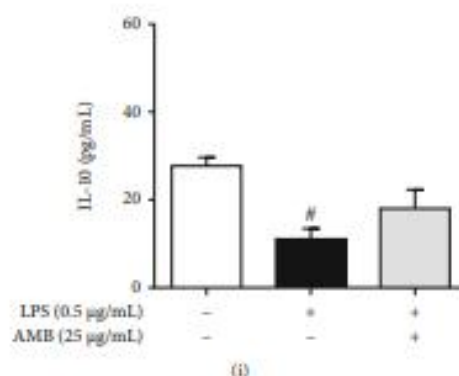


FIGURE 3: Effects of DEAC, CM, and AMB on inflammatory cytokine release in LPS-stimulated BV-2 cells. Cells were pretreated with DEAC (100 µg/mL), CM (50 and 100 µg/mL), and AMB (25 µg/mL) for 1 h and activated with LPS (0.5 µg/mL) for additional 24 h. The results are expressed as mean ± SEM. For statistical analysis, one-way ANOVA was used followed by the Bonferroni posttest. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. negative control (0.1% DMSO, drug vehicle); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS group,  $n = 4$ /group.

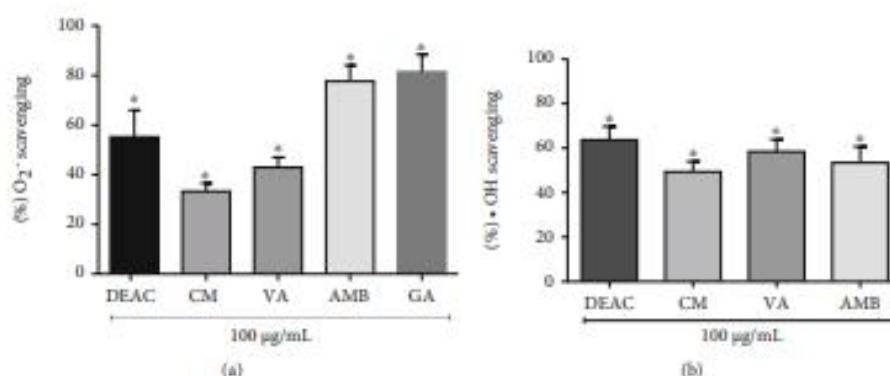


FIGURE 4: Antioxidant activity assay of DEAC, CM, VA, and AMB (100 µg/mL). Scavenging effect on (a) superoxide anion and (b) hydroxyl radical. For statistical analysis, a one-sample  $t$ -test was used, \* vs. 100%.

cells. When activated, these cells release several inflammatory and potentially neurotoxic mediators, including proteases, excitatory amino acids, cytokines, ROS, and reactive nitrogen species (RNS). Lipopolysaccharide, a bacterial endotoxin, is extensively used as an inflammatory stimulus for microglial activation [28]. This experimental model has been a useful tool to understand the role of neuroinflammation in the progression of neurological diseases. The production of inflammatory mediators after stimulation with LPS is the result of a sequence of reactions that begins at the binding of LPS to cell membrane receptors which activate a cascade of intracellular signaling pathways, resulting in the release of several mediators, including nitric oxide (NO). DEAC and its compounds, except VA, decreased nitrite production, elevated by the exposure to LPS, without significantly affecting cell viability, as assessed by the MTT test. Additionally, the plant extract and all chemical constituents evaluated (CM, AMB, and VA) showed antioxidant activity, acting as scavengers of hydroxyl and superoxide anion radicals. These results are consistent with previous studies devel-

oped by our laboratory which showed the anti-inflammatory and antioxidant effect of AMB and isokaempferide (flavonol) from *A. caudensis* in mesencephalic cells of rats exposed to the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), human neutrophils, and/or CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats [11, 18, 29].

Nitric oxide is associated with both beneficial and deleterious effects in humans. In the central nervous system (CNS), the iNOS upregulation and the accumulation of NO exacerbate the neuroinflammatory microenvironment, which contributes to neuronal cell death. The toxicity of NO is enhanced when it is combined with superoxide anion, generating peroxynitrite anion [30]. Decomposition of peroxynitrite results in the formation of some highly reactive species such as hydroxyl radicals [31]. Previous studies [32, 33] showed that higher hydroxyl radical levels and lower superoxide dismutase activity, an oxidoreductase responsible to dismutate the superoxide anion, seem to contribute to the onset and progression of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Therefore, the

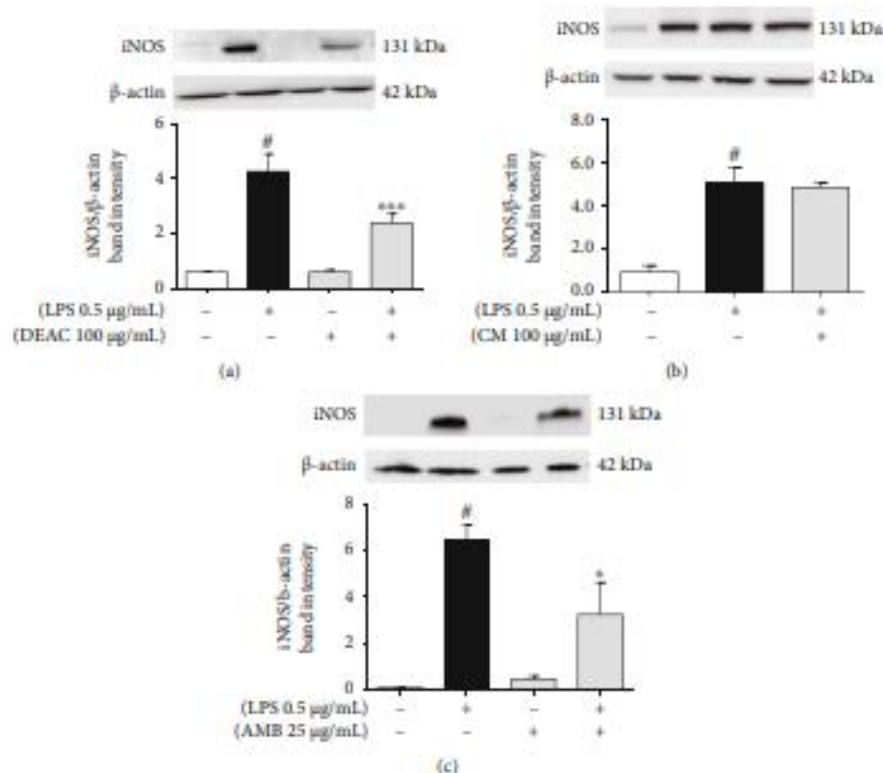


FIGURE 5: Effects of DEAC (a), CM (b), and AMB (c) on iNOS expression in LPS-stimulated BV-2 cells. Cells were pretreated with DEAC (100 μg/mL), CM (50 and 100 μg/mL), or AMB (25 μg/mL) for 1 h and incubated with LPS (0.5 μg/mL) for additional 24 h. Two-way ANOVA in graphs (a) and (c), and one-way ANOVA for graph (b), followed by Bonferroni posttest. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. negative control (0.1% DMSO, drug vehicle), <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs. LPS group,  $n = 4$ /group.

reduction of nitrite concentration and the scavenging activity of hydroxyl and superoxide anion radicals exerted by DEAC and its active compounds suggest that DEAC's anti-inflammatory effects reduce the accumulation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) which play a major role in neuroinflammation-induced neuronal death [34]. Corroborating these data, Yeo et al. [35], describing the anti-inflammatory activity of a *Piper sarmentosum* extract in microglial cells, showed that the inhibition of NO production by the plant extract was associated with its free radical scavenging property.

Apart from NO, proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  are triggers of the inflammatory response and contribute to maintaining the high microglial activity that sustains the development of chronic inflammatory diseases [25]. These pathologies can be controlled by reducing the proinflammatory response and/or improving natural anti-inflammatory mechanisms. Thus, our study also investigated the effect of DEAC, CM, or AMB on the level of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated BV-2 cells. Importantly, DEAC, CM, and AMB inhibited LPS-induced release of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6), but we did not observe significant effects on the IL-10 (anti-inflammatory cytokine) reduction caused

by LPS. Collectively, these data suggest that DEAC and its active principles CM and AMB may protect against neuronal death considering that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  act synergistically as neurotoxic agents mediated at least in part by NO [36]. This hypothesis is corroborated by previous studies [15] where we described the anti-inflammatory and antioxidant activities of AMB from *A. cearensis* in mesencephalic cells of rats exposed to neurotoxin 6-OHDA.

NO synthesis can be limited by arginine availability and/or on the level of iNOS protein expression. During the NO synthesis, arginase-1 (expressed in microglial cells) competes with iNOS for L-arginine [37, 38]. Therefore, we investigated the effect of DEAC and its compounds on iNOS expression and arginase catalytic activity in LPS-stimulated BV-2 cells. We observed that LPS induced an increase in iNOS expression in BV-2 microglial cells, and pretreatment with DEAC or AMB decreased the expression of this enzyme. Meanwhile, the addition of CM in BV-2 cells did not affect the iNOS expression, and none of the test drugs improved the arginase activity when compared to the LPS-only group. Taken together, these results demonstrate that the inhibition of NO production by the extract of *A. cearensis* and AMB in microglial cells is related, at least in part, to their ability to reduce iNOS expression in microglial cells. Additional

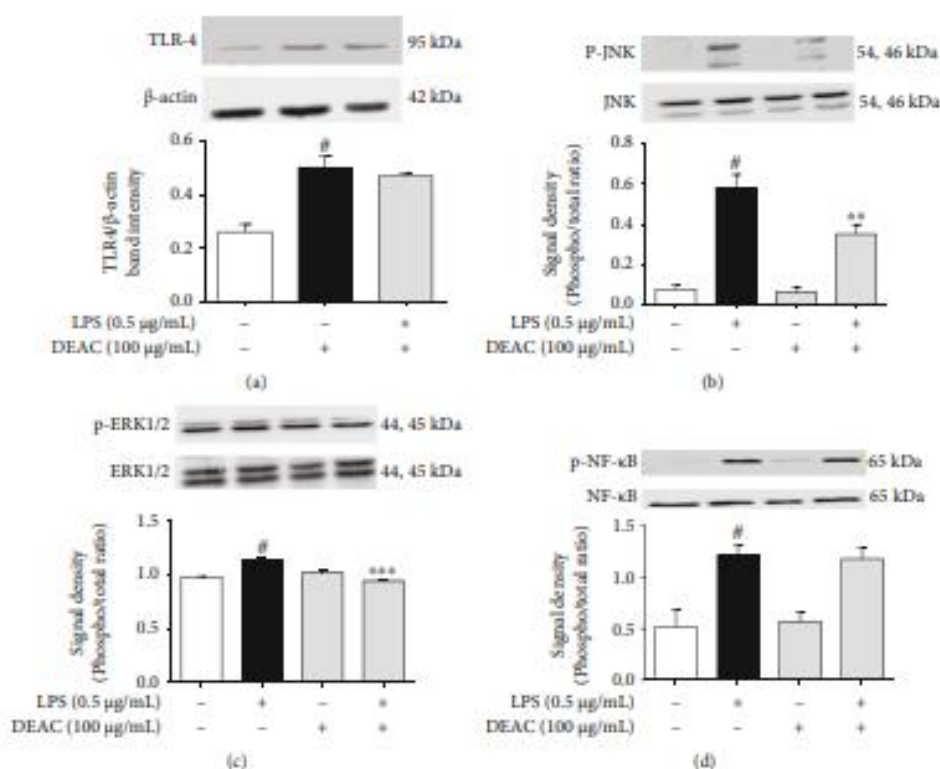


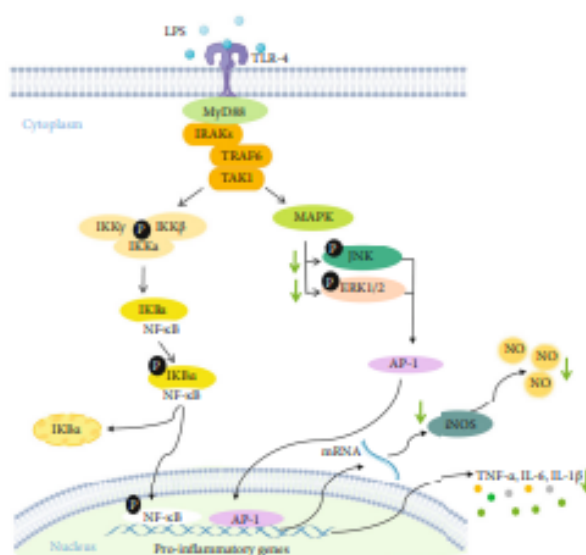
FIGURE 6: Effects of DEAC on TLR-4, p-NF- $\kappa$ B, p-JNK, and p-ERK1/2 expression in LPS-stimulated BV-2 cells. Cells were pretreated with DEAC (100  $\mu$ g/mL) for 1 h and incubated with LPS (0.5  $\mu$ g/mL) for 1 more hour. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, one-way ANOVA (a), two-way ANOVA (b–d), followed by Bonferroni posttest. <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. negative control (0.1% DMSO, drug vehicle), <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs. LPS group,  $n = 4$ /group.

studies are necessary to describe how CM reduced the nitrite production in LPS-stimulated BV-2 cells without affecting iNOS expression. We hypothesize that it may act as an iNOS inhibitor.

The anti-inflammatory and antioxidant activities of DEAC described in the present study in microglial cells are corroborated by a previous study by Pereira et al. [13] which described the neuroprotective effect of an *A. caereensis* seed extract against neural damage induced by glutamate in cerebellar cells, which was associated to glial and neuronal preservation, and antioxidant activity. As DEAC's main bioactive markers CM and AMB showed a promising anti-inflammatory effect, we then further described the mechanisms underlying DEAC-mediated attenuation of inflammation in BV-2 cells. There are several published works describing *A. caereensis* or its active principles' anti-inflammatory or antioxidant activities [10, 11, 15, 17, 29, 39–41]. However, these studies are mainly confined to just showing their effects without further investigating the molecular mechanism underlying them. Therefore, the present study investigated the role of TLR-4, NF- $\kappa$ B, and MAPK signaling pathways in the anti-inflammatory effect of DEAC in LPS-stimulated BV-2 cells. The binding of TLR-4 on the

cell membrane by LPS in BV-2 cells activates various signaling cascades, including NF- $\kappa$ B pathway via the MyD88-IRAK-TRAF6-TAK1 signaling complex leading to the activation of I $\kappa$ B kinase complex (IKK). Activation of IKK includes the phosphorylation of NF- $\kappa$ B which leads to its translocation to the nucleus. As a transcription factor, NF- $\kappa$ B stimulates the synthesis of proinflammatory mediators including NO, IL-6, and TNF- $\alpha$  and the secretion of ROS. In addition to NF- $\kappa$ B, LPS is a potent activator of the MAPK signaling pathways, which in turn modulate the activation of several transcription factors, including activator protein-1 (AP-1), STAT-1, and NF- $\kappa$ B. AP-1 upregulates cytokine expression playing a key role in neuroinflammation [42–45]. In the present study, we found that DEAC treatment significantly inhibited LPS-stimulated phosphorylation of two MAP kinase pathways (JNK and ERK1/2) in microglial cells. However, DEAC did not interfere in the increased expression of TLR-4 or phosphorylation of NF- $\kappa$ B induced by LPS (Figure 7).

Evidence demonstrates that excessive production of inflammatory mediators acts as inductors of MAPKs which in turn amplify and prolongs the inflammation process [45]. This vicious cycle leads to neuronal damage and death



**FIGURE 7:** Proposed signaling mechanism for the effects of DEAC and chemical constituents (CM and AMB) in LPS-induced neuroinflammation in BV-2 cells. Activation of toll-like receptor 4 (TLR-4) with LPS leads to activation of the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. The IKK complex phosphorylates I $\kappa$ B $\alpha$ , which leads to the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and subsequent nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. At the same time, the MAPK pathway (JNK and ERK1/2) regulates the transcription of inflammatory mediators through the activation of the transcription factor AP-1. Activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 results in the expression of iNOS and the production of proinflammatory mediators. DEAC disrupts LPS-induced neuroinflammatory pathways, decreasing JNK and ERK1/2 signaling. DEAC and chemical constituents decrease the expression of iNOS, as well as the production of inflammatory mediators (NO and cytokines). IKK: I $\kappa$ B kinase complex; I $\kappa$ B $\alpha$ : kappa B inhibitor; P: phosphate; NF- $\kappa$ B: nuclear kappa factor B; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular signal regulatory kinase; AP-1: activator protein 1.

which is a hallmark of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) [45]. Both JNK and ERK promote the phosphorylation of amyloid precursor protein that, when cleaved by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, yields the neurotoxic  $\beta$ -amyloid peptide which plays a key role in AD. In addition, studies demonstrated that TNF- $\alpha$ , a classical factor secreted from activated microglia, can induce a significant increase in the  $\alpha$ -SNC secretion (a marker of PD) from both differentiated PC12 and SHSY5Y cells [35, 42]. Therefore, the inhibition of MAPK pathways by DEAC indicates that it may be a promising anti-inflammatory drug, useful for the treatment of neurodegenerative disorders.

The anti-inflammatory effect of DEAC is associated at least in part with the presence of AMB and CM in the plant extract, but the pharmacological importance of other chemical constituents from *A. cearensis* cannot be excluded. Moreover, the present work studied the effects of different drugs in an isolated microglial cell line; therefore, the anti-inflammatory activity observed may not fully represent an *in vivo* effect in reducing neuroinflammation. Because of this, future trials should be carried out using experimental animal models of neurodegenerative diseases to evaluate the effect of DEAC, AMB, and CM, investigating the anti-inflammatory, antioxidant, and consequent

neuroprotective potential. The *in vivo* study will allow to know if these drugs have limitations associated to bioavailability and how they act in living system with complex interplay between the different cell types at different time points in the progression of neuroinflammatory diseases.

## 5. Conclusion

Taken together, our results demonstrate that DEAC and its active principles (AMB and CM) (100  $\mu$ g/mL) have free radical scavenging activity and inhibit the production of NO (up to 100  $\mu$ g/mL). At their concentrations that reduced at least 50% of NO production, they also reduced the release of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 as well as the expression of iNOS in LPS-stimulated BV-2 microglial cells (DEAC at 100  $\mu$ g/mL, CM at 50 and 100  $\mu$ g/mL, and AMB at 25  $\mu$ g/mL). These effects were not related to cytotoxicity and seem to occur through inhibition JNK and ERK1/2 MAPK pathways (DEAC at 100  $\mu$ g/mL). These data provide an experimental basis that the standardized dry extract of *A. cearensis* (cultivated species), CM, and AMB presents therapeutic potential for the treatment of inflammatory diseases where microglial activation plays a key role, such as neurodegenerative diseases.

## Abbreviations

6-OHDA:	6-Hydroxydopamine
AD:	Alzheimer's disease
AMB:	Amburoside A
AP-1:	Activator protein-1
BSA:	Bovine serum albumin
CNS:	Central nervous system
CM:	Coumarin
DEAC:	Dry extract from <i>Amburana cearensis</i>
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
FBS:	Fetal bovine serum
FeCl <sub>3</sub> :	Ferric chloride
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hydrogen peroxide
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :	Phosphoric acid
HPLC-PDA:	High-performance liquid chromatography-photodiode array
HPX:	Hypoxanthine
IFN- $\gamma$ :	Interferon-gamma
IKK:	I $\kappa$ B kinase complex
IL:	Interleukin
iNOS:	Inducible nitric oxide synthase
JNK:	C-Jun N-terminal kinase
L-Ascorbic acid:	Vitamin C
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPKs:	Mitogen-activated protein kinases
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBT:	Nitrotetrazolium blue chloride
NEED:	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride
NF- $\kappa$ B:	Nuclear factor kappa B
NO:	Nitric oxide
PBS:	Phosphate-buffered saline
PD:	Parkinson's disease
RIPA:	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNS:	Reactive nitrogen species
ROS:	Reactive oxygen species
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
TBA:	2-Thiobarbituric acid
TCA:	Trichloroacetic acid
TLR-4:	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$ :	Tumor necrosis factor alpha
VA:	Vanillic acid
XOD:	Xanthine oxidase.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

L.K.A.M. Leal acknowledges the Brazilian National Research Council (CNPq) for their research fellowships (316948/2021-7). This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Foundation of the State of Ceara (FUNCAP), and CNPq.

## References

- [1] F. Leng and P. Edison, "Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?," *Nature Reviews Neurology*, vol. 17, no. 3, pp. 157–172, 2021.
- [2] R. M. Ransohoff, "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration," *Science*, vol. 353, no. 6301, pp. 777–783, 2016.
- [3] Z. Yu, L. Tang, L. Chen, J. Li, W. Wu, and C. Hu, "Capillaritis suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells by suppressing TLR4-mediated NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathway," *Neurochemical Research*, vol. 40, no. 6, pp. 1095–1101, 2015.
- [4] S.-C. Ho, K.-S. Chang, and P.-W. Chang, "Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 4, pp. 2275–2282, 2013.
- [5] L. Heinbockel, G. Weindl, G. Martinez-de-Tejada et al., "Inhibition of lipopolysaccharide- and lipoprotein-induced inflammation by antitoxin peptide Pep19-2.5," *Frontiers in Immunology*, vol. 9, pp. 1–6, 2018.
- [6] W. Abate, A. A. Alghaithy, J. Parton, K. P. Jones, and S. K. Jackson, "Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting translocation of TLR4 into lipid raft domains," *Journal of Lipid Research*, vol. 51, no. 2, pp. 334–344, 2010.
- [7] X. Zhu, J. S. Owen, M. D. Wilson et al., "Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol[S]," *Journal of Lipid Research*, vol. 51, no. 11, pp. 3196–3206, 2010.
- [8] H. G. Kim, G. Park, Y. Piao et al., "Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, pp. 293–300, 2014.
- [9] N. S. Mohd Sairazi and K. N. S. Sirajudeen, "Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potentials against neurodegenerative diseases," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2020, 7 pages, 2020.
- [10] H. H. D. S. Amaral, "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 neurofílica in vitro," *Universidade Federal do Ceará*, 2017.
- [11] L. K. A. M. Leal, K. M. Canuto, K. C. da Silva Costa et al., "Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, vol. 104, no. 3, pp. 198–205, 2009.
- [12] J. H. C. E. Silva, R. S. Ferreira, E. P. Pereira et al., "*Amburana cearensis*: pharmacological and neuroprotective effects of its compounds," *Molecules*, vol. 25, no. 15, pp. 3316–3394, 2020.

- [13] É. P. Lima Pereira, C. Santos Souza, J. Amparo et al., "Amburana cearensis seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 209, pp. 157–166, 2017.
- [14] E. C. Pereira, D. L. Lucetti, J. M. Barbosa-Filho et al., "Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus," *Neuroscience Letters*, vol. 454, no. 2, pp. 139–142, 2009.
- [15] L. K. A. M. Leal, H. V. N. Júnior, G. M. A. Cunha et al., "Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity," *Neuroscience Letters*, vol. 388, no. 2, pp. 86–90, 2005.
- [16] L. K. A. M. Leal, T. M. Pierdoná, J. G. S. Góes et al., "A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith," *Phytomedicine*, vol. 18, no. 2-3, pp. 230–233, 2011.
- [17] N. R. Lima, "Desenvolvimento farmacêutico e avaliação farmacológica do extrato padronizado (CLAE-DAD) e constituintes químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivado," *Universidade Federal do Ceará*, 2013.
- [18] K. M. Canuto, E. R. Silveira, and A. M. E. Bezerra, "Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith)," *Química Nova*, vol. 33, no. 3, pp. 662–666, 2010.
- [19] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [20] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, "Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids," *Analytical Biochemistry*, vol. 126, no. 1, pp. 131–138, 1982.
- [21] H. Zhao, J. Dong, J. Lu et al., "Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 19, pp. 7277–7286, 2006.
- [22] E. K. Hodgson and I. Fridovich, "The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase: A requiem for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 430, no. 1, pp. 182–188, 1976.
- [23] Z. Zhao, L. Tao, A. Liu et al., "NF- $\kappa$ B is a key modulator in the signaling pathway of *Borrelia burgdorferi* BmpA-induced inflammatory chemokines in murine microglia BV2 cells," *Molecular Medicine Reports*, vol. 17, no. 4, pp. 4953–4958, 2018.
- [24] I. M. Corraliza, M. L. Campo, G. Soler, and M. Modolell, "Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method," *Journal of Immunological Methods*, vol. 174, no. 1-2, pp. 231–235, 1994.
- [25] S. Bachiller, I. Jiménez-Ferrer, A. Paulus et al., "Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, pp. 1–17, 2018.
- [26] H. S. Kwon and S.-H. Koh, "Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes," *Translational Neurodegeneration*, vol. 9, no. 1, p. 42, 2020.
- [27] L. Muzio, A. Viotti, and G. Martino, "Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: from understanding to therapy," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 15, 2021.
- [28] S. Lively and L. C. Schlichter, "Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10)," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, p. 215, 2018.
- [29] L. K. A. M. Leal, F. Fonseca, F. Pereira et al., "Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats," *Planta Medica*, vol. 74, no. 5, pp. 497–502, 2008.
- [30] H. L. Hsieh and C. M. Yang, "Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases," *Bio Med Research International*, vol. 2013, 2013.
- [31] S. Tharmalingam, A. Alhasawi, V. P. Appanna, J. Lemire, and V. D. Appanna, "Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications," *Biological Chemistry*, vol. 398, no. 11, pp. 1193–1208, 2017.
- [32] E. Kienzl, K. Jellinger, H. Stachelberger, and W. Linert, "Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease?," *Life Sciences*, vol. 65, no. 18–19, pp. 1973–1976, 1999.
- [33] F. Collin, "Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 10, 2019.
- [34] J. E. Yuste, E. Tarragon, C. M. Campuzano, and F. Ros-Bernal, "Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, pp. 1–13, 2015.
- [35] E. T. Y. Yeo, K. W. L. Wong, M. L. See, K. Y. Wong, S. Y. Gan, and E. W. L. Chan, "Piper sarmentosum Roxb. confers neuroprotection on beta-amyloid (A $\beta$ )-induced microglia-mediated neuroinflammation and attenuates tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 217, pp. 187–194, 2018.
- [36] C. C. Chao, S. X. Hu, L. Ehrlich, and P. K. Peterson, "Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of n-methyl-D-aspartate receptors," *Brain Behavior and Immunity*, vol. 9, no. 4, pp. 355–365, 1995.
- [37] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, and M. Munder, "Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, pp. 1–11, 2014.
- [38] C. D. Mills, L. L. Lenz, and K. Ley, "Macrophages at the fork in the road to health or disease," *Frontiers in Immunology*, vol. 6, pp. 1–7, 2015.
- [39] L. K. A. M. Leal, M. Nechio, E. R. Silveira et al., "Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith," *Phytotherapy research : PTR*, vol. 17, no. 4, pp. 335–340, 2003.
- [40] Z. Balion, K. Ramanauskienė, A. Jekabsone, and D. Majienė, "The role of mitochondria in brain cell protection from ischemia by differently prepared propolis extracts," *Antioxidants*, vol. 9, no. 12, pp. 1–20, 2020.
- [41] P. de Araújo Rodrigues, S. M. de Moraes, J. F. Pereira et al., "Neuroprotective effects of proanthocyanidins of grape seed extracts against oxidative stress and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells," *Conjecturas*, vol. 21, no. 2, pp. 68–86, 2021.

- [42] T. Ahmed, A. Zulfikar, S. Arguelles et al., "Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration," *Pharmacological Research*, vol. 160, 2020.
- [43] C. J. Wei, Y. L. Li, Z. L. Zhu et al., "Inhibition of activator protein 1 attenuates neuroinflammation and brain injury after experimental intracerebral hemorrhage," *CNS Neuroscience and Therapeutics*, vol. 25, no. 10, pp. 1182–1188, 2019.
- [44] M. Rahimifard, F. Maqbool, S. Moeini-Nodeh et al., "Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation," *Ageing Research Reviews*, vol. 36, pp. 11–19, 2017.
- [45] C. R. A. Batista, G. F. Gomes, E. Candelario-Jalil, B. L. Fiebich, and A. C. P. de Oliveira, "Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 9, p. 2293, 2019.