



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



FLÁVIA SANTOS SANCHES

**AÇÃO CITOPROTETORA DE COMPOSTOS PRESENTES
NO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DE SEMENTES DA
AMBURANA CEARENSIS EM MODELO AGUDO DE
ISQUEMIA ENCEFÁLICA**

Salvador - BA

2024

FLÁVIA SANTOS SANCHES

**AÇÃO CITOPROTETORA DE COMPOSTOS PRESENTES
NO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DE SEMENTES DA
AMBURANA CEARENSIS EM MODELO AGUDO DE
ISQUEMIA ENCEFÁLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Coorientador: Dr. Rafael Short Ferreira

Salvador - BA

2024

S211 Sanches, Flávia Santos

Ação citoprotetora de compostos presentes no extrato diclorometânico de sementes da amburana cearensis em módulo agudo de isquemia encefálica/ Flávia Santos Sanches. – Salvador, 2024.
49 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva; Coorientadora: Prof. Dr. Rafael Short Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Inclui referências e apêndices.

1. Isquemia encefálica. 2. Amburana cearensis. 3. Cumarina. 4. Via ERK/ MAPK. I. Silva, Victor Diogenes Amaral da. II. Ferreira, Rafael Shot. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.831-005

Responsável técnica Maria de Fátima Mendes Martinelli – CRB/5-551
Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI



TERMO DE APROVAÇÃO DO EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Flávia Santos Sanches

“AÇÃO CITOPROTETORA DE COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO DICLOROMETANO DE SEMENTES DA AMBURANA CEARENSIS EM MODELO AGUDO DE AVE ISQUÊMICO”.

14 de junho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
gov.br VICTOR DIOGENES AMARAL DA SILVA
Data: 11/07/2024 12:36:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
(UFBA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br MAURO CUNHA XAVIER PINTO
Data: 17/06/2024 17:49:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto (Membro Externo ao PMBqBM)
Universidade Federal de Goiás

Documento assinado digitalmente
gov.br ANIBAL DE FREITAS SANTOS JUNIOR
Data: 17/06/2024 10:51:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior (Membro Externo ao PMBqBM)
Universidade do Estado da Bahia

FLÁVIA SANTOS SANCHES

**AÇÃO CITOPROTECTORA DE COMPOSTOS PRESENTES
NO EXTRATO DICLOROMETÂNICO DE SEMENTES DA
AMBURANA CEARENSIS EM MODELO AGUDO DE
ISQUEMIA ENCEFÁLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Universidade Federal da Bahia, Brasil

Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto
Universidade Federal de Goiás, Brasil

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Júnior
Universidade do Estado da Bahia, Brasil

“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

*-Albus Dumbledore
(J. K. Rowling)*

SANCHES, Flávia. Ação citoprotetora de compostos presentes no extrato diclorometânico de sementes da *Amburana cearensis* em modelo agudo de isquemia encefálica. 49fl. 2024. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

RESUMO

A isquemia encefálica é caracterizada pela interrupção de suprimento sanguíneo, diminuindo a oferta de oxigênio e nutrientes para o tecido nervoso. Como consequência, ocorre déficit energético, estresse oxidativo e inflamação, que levam a morte celular. A excitotoxicidade glutamatérgica é um dos mecanismos fisiopatológicos presentes em doenças neurodegenerativas crônicas e agudas, como o acidente vascular encefálico isquêmico. O excesso de glutamato promove apoptose nos neurônios, aumentando a entrada de Ca^{2+} na célula, resultando em danos ao DNA e morte celular. Por outro lado, os astrócitos controlam ativamente o excesso de glutamato para prevenir a morte neuronal. Nossos estudos anteriores demonstraram melhora na função de células neurais tratadas com compostos presentes no extrato de diclorometano das sementes de *Amburana cearensis* (EDAC) contra a privação de oxigênio e glicose (OGD) e estresse pelo excesso de glutamato. No entanto, mais estudos precisam ser feitos para compreender mais a fundo os mecanismos e caracterizar a cumarina, principal composto do EDAC, como agente farmacologicamente ativo. Sabe-se que a isquemia cerebral pode levar à ativação de cascatas como PI3K/AKT e MAPK, aumentando a expressão de proteínas como AKT e ERK1/2, e também modular a expressão da glutamina sintetase (GS), marcador de astrogliose, que converte glutamato em glutamina, um aminoácido não tóxico. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar o mecanismo de ação do EDAC e da cumarina isolada na regulação de proteínas da via MAPK e AKT modelo *in vitro* de AVE isquêmico. Assim, linhagens celulares PC12 foram submetidas a OGD ou glutamato (20 mM) e/ou tratadas concomitantemente com EDAC (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cumarina (500 $\mu\text{m}/\text{mL}$) por 24 horas. Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada por iodeto de propídeo ou MTT. Além disso, a expressão das proteínas da via AKT e MAPK foi investigada por Western Blot, e a expressão da caspase 3 por imunofluorescência. EDAC e cumarina foram capazes de proteger células PC12 em condição de OGD e o EDAC foi capaz de proteger as células contra a toxicidade do glutamato (20 mM). Ambos foram capazes de regular a expressão de AKT, ERK1/2 e ERK fosforilada e regular negativamente a caspase 3. Nossos resultados demonstram que EDAC e cumarina têm um potencial efeito farmacológico em modelos agudos de isquemia e esclarecem os mecanismos de ação relacionados ao efeito neuroprotetor de compostos de sementes de *A. cearensis* em modelo de estudo de isquemia encefálica.

Palavras-chaves: Isquemia encefálica, *Amburana cearensis*, cumarina, via ERK/MAPK.

SANCHES, Flávia. Cytoprotective action of compounds present in the dichloromethane extract of *Amburana cearensis* seeds in an acute model of brain ischemia. 49fl. 2024. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

ABSTRACT

Brain ischemia is characterized by the interruption of blood supply, reducing the supply of oxygen and nutrients to the nervous tissue. As a consequence, energy deficit, oxidative stress and inflammation occur, which lead to cell death. Glutamatergic excitotoxicity is one of the pathophysiological mechanisms present in chronic and acute neurodegenerative diseases, such as ischemic stroke. Excess glutamate promotes apoptosis in neurons, increasing the entry of Ca^{2+} into the cell, resulting in DNA damage and cell death. On the other hand, astrocytes actively control excess glutamate to prevent neuronal death. Our previous studies demonstrated improvement in the function of neural cells treated with compounds present in the dichloromethane extract of *Amburana cearensis* seeds (EDAC) against oxygen and glucose deprivation (OGD) and stress due to excess glutamate. However, more studies need to be carried out to better understand the mechanisms and characterize coumarin, the main compound in EDAC, as a pharmacologically active agent. It is known that cerebral ischemia can lead to the activation of cascades such as PI3K/AKT and MAPK, increasing the expression of proteins such as AKT and ERK1/2, and also modulating the expression of glutamine synthetase (GS), a marker of astrogliosis, which converts glutamate into glutamine, a non-toxic amino acid. Therefore, this study aims to investigate the mechanism of action of EDAC and isolated coumarin in the regulation of MAPK and AKT pathway proteins in vitro model of ischemic stroke. Thus, PC12 cell lines were subjected to OGD or glutamate (20 mM) and/or concomitantly treated with EDAC (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and coumarin (500 $\mu\text{m}/\text{mL}$) for 24 hours. Subsequently, cell viability was assessed by propidium iodide or MTT. Furthermore, the expression of AKT and MAPK pathway proteins was investigated by Western Blot, and the expression of caspase 3 by immunofluorescence. EDAC and coumarin were able to protect PC12 cells in OGD condition and EDAC was able to protect cells against glutamate toxicity (20 mM). Both were able to regulate the expression of AKT, ERK1/2 and phosphorylated ERK and negatively regulate caspase 3. Our results demonstrate that EDAC and coumarin have a potential pharmacological effect in acute models of ischemia and clarify the mechanisms of action related to the effect neuroprotective compound from *A. cearensis* seeds in a study model of brain ischemia.

Keywords: Cerebral ischemia, *Amburana cearensis*, coumarin, ERK/MAPK pathway

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Regiões do cérebro isquêmico.....	14
FIGURA 2: Células do sistema nervoso central (SNC).....	16
FIGURA 3: Representação da via PI3K/ AKT após isquemia.....	18
FIGURA 4: Representação da via MAPK.....	19
FIGURA 5: Representação da via de apoptose após isquemia.....	20
FIGURA 6: Caracterização química da cumarina isolada.....	30
FIGURA 7: Efeito do EDAC na viabilidade celular de células PC12 submetidas a condição de privação de oxigênio e glicose (OGD) e condição normais (OGN)	31
FIGURA 8: Efeito da cumarina na viabilidade celular de células PC12 submetidas a condição de privação de oxigênio e glicose (OGD) e condição normais (OGN)	32
FIGURA 9: Efeitos do glutamato na viabilidade celular de células PC12.....	33
FIGURA 10: Efeitos do EDAC e da cumarina na viabilidade celular de células PC12.....	33
FIGURA 11: Efeitos do tratamento concomitante (glutamato + EDAC) e (glutamato + cumarina) na viabilidade celular de células PC12	34
FIGURA 12: Imunofluorescência para caspase3 em células PC12	35
FIGURA 13: Western Blotting para detecção de AKT.....	36
FIGURA 14: Western Blotting para detecção de ERK e p-ERK	37
FIGURA 15: Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células PC12.....	38
FIGURA 16: Efeitos do glutamato na viabilidade celular de cultura primária de astrócitos	47
FIGURA 17: Efeitos do EDAC e da cumarina na viabilidade celular em cultura primária de astrócitos	48
FIGURA 18: Efeitos do tratamento concomitante (glutamato + EDAC) e (glutamato + cumarina) na viabilidade celular de astrócitos de cultura primária.	49
FIGURA 19: Western Blotting para detecção de glutamina sintetase (GS).....	49

ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca^{2+}	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Gás carbônico
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDAC	Extrato Diclorometano de <i>Amburana cearenses</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
GLUT	Glutamato
GS	Glutamina sintetase
I/R	Isquemia-reperfusão
LabNq	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitogênio
Mg^{2+}	Íon magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na^+	Íon sódio
NGF	Fator de crescimento nervoso
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
OGD	Privação de oxigênio e glicose

OGN	Condições normais de oxigênio e glicose
PBS	Tampão Salino Fosfato
PC12	Feocromocitoma da medula adrenal de rato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SE	Soro Equino
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	13
2.2 EPIDEMIOLOGIA	14
2.3 FISIOPATOLOGIA DO AVE.....	15
2.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO AVE	17
2.4.1 PI3K/AKT	17
2.4.2 PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITOGÊNIO (MAPK).....	18
2.4.3 APOPTOSE	20
2.5 POTENCIAL TERAPÊUTICO DE COMPOSTOS DE SEMENTE DE AMBURANA CEARENSIS CONTRA AVC	21
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DICLOROMETANO DE <i>AMBURANA CEARENSIS</i> (EDAC), ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA.....	23
5.2 CULTURA DE CÉLULAS PC12	24
5.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS	24
5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE GLUTAMATO E SOLUÇÃO ESTOQUE DE EDAC E CUMARINA E TRATAMENTO DAS CÉLULAS	25
5.5 ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTT EM PC12	25
5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTT EM ASTRÓCITOS.....	26
5.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS PC12	26
5.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING EM CÉLULAS PC12 E ASTRÓCITOS DE CULTURA PRIMÁRIA	27
5.9 PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (OGD) E TRATAMENTO	27
5.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR IODETO DE PROPÍDIO.....	28
5.11 ENSAIO QUANTITATIVO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	28
5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
6. RESULTADOS	29
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA CUMARINA	29

6.2 EDAC E CUMARINA PROTEGEM CÉLULAS PC12 CONTRA DANO INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (OGD)	30
6.3 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO GLUTAMATO SÃO TÓXICOS PARA CÉLULAS PC12	32
6.4 EDAC E CUMARINA NÃO SÃO TÓXICOS PARA CÉLULAS PC12	33
6.5 EDAC E CUMARINA PROTEGEM CÉLULAS PC12 CONTRA EXCITOTOXICIDADE DO GLUTAMATO	34
6.6 EDAC E CUMARINA MODULAM A APOPTOSE EM CÉLULAS PC12 A PARTIR DO DANO GERADO POR GLUTAMATO	35
6.7 EDAC E CUMARINA AUMENTAM A EXPRESSÃO DE AKT EM CÉLULAS PC12 A PARTIR DO DANO GERADO POR GLUTAMATO	35
6.8 EDAC E CUMARINA REDUZIRAM A EXPRESSÃO DE ERK E P-ERK EM CÉLULAS PC12 A PARTIR DO DANO GERADO POR GLUTAMATO	36
6.9 EDAC E CUMARINA DIMINUEM A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS PC12 EXPOSTAS A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	37
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
10. APÊNDICE	47
10.1 GLUTAMATO (20 MM) É TÓXICO PARA CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS	47
10.2 EDAC E CUMARINA NÃO SÃO TÓXICOS PARA CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS	47
10.3 EDAC E DA CUMARINA NÃO PROTEGEM CONTRA DANO INDUZIDO POR GLUTAMATO EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS	48
10.4 EDAC E CUMARINA AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GLUTAMINA SINTETASE (GS) EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS A PARTIR DO DANO GERADO POR GLUTAMATO	49

1. Introdução

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é definido como uma lesão vascular aguda no Sistema Nervoso Central (SNC) causada por uma oclusão de artérias que levam à redução no fluxo sanguíneo, podendo ser classificado em isquêmico e hemorrágico (Campbell et al., 2020). No AVE isquêmico ocorre uma interrupção de suprimento de sangue para o encéfalo, diminuindo a oferta de oxigênio e nutrientes para as células nervosas, gerando déficits neurológicos e morte celular (Lee et al., 2018). Oitenta e sete por cento (87%) dos casos de AVE são isquêmicos. Somadas, as formas de AVE atingem cerca de 13,7 milhões de pessoas por ano e é a segunda causa de morte globalmente, podendo afetar 1 a cada 4 pessoas. Dados mostram que 5,5 milhões de mortes são registradas por ano e mais de 80 milhões de pessoas convivem com as sequelas da doença no mundo (Campbell et al., 2019).

Após a lesão causada pelo AVE, uma série de mecanismos celulares são acionados. A resposta inflamatória à lesão pode ter um efeito inesperado, impulsionando a liberação demasiada de citocinas e radicais livres que culminam em lesão celular. Paralelamente a isso, células gliais podem tornar-se reativas, comprometendo a integridade da barreira hematoencefálica levando a morte celular. Outros mecanismos de morte celular envolvidos são o influxo em excesso de cálcio, comprometimento mitocondrial, estresse oxidativo, dobramento incorreto de proteínas, dentre outros (Sekerdag et al., 2018). Uma das vias que promove a apoptose ocorre pelo aumento da entrada de Ca^{2+} na célula, causado pela excitotoxicidade glutamatérgica e acidose láctica. O excesso de cálcio resulta na ativação de proteínas que podem provocar a degradação do DNA e, conseqüentemente, à morte celular. Além dessa via, a isquemia encefálica pode levar a ativação da cascata de PI3K/AKT (Datta, et al. 2020).

As alterações moleculares relacionadas à morte de células do SNC por dano isquêmico envolvem também a ativação da via MAPK, que corresponde a uma família de proteínas quinases ativadas por mitogênio (Ras, Raf, MEK e ERK1 / 2) (Datta, et al. 2020). No entanto, esta pode ter caráter dúbio. Recentemente, algumas pesquisas mostraram que o período, grau e localização da lesão podem determinar se a via ERK1/2 será protetora ou agravará a lesão. Ainda assim, muitos estudos têm sido voltados para atuação de fármacos nessa via (Kong et al., 2019).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) demonstraram a ação neuroprotetora de extratos de sementes de *Amburana cearensis*. Dentre eles, o extrato diclorometânico (EDAC) apresentou o maior potencial farmacológico em modelos de excitotoxicidade glutamatérgica e em modelo de isquemia aguda (Pereira, et al. 2017a; Ferreira et al., 2023). Os últimos estudos apontaram que a ativação de células gliais, em especial dos astrócitos, pode estar envolvida nos mecanismos de ação pelos quais os compostos do EDAC atuam como neuroprotetores, no entanto estudos anteriores realizados em células PC12, que é uma linhagem de células derivadas de feocromocitoma, também apontam ação citoprotetora do EDAC (Pereira, et al. 2017a; Pereira, et al. 2017b; Ferreira et al., 2023). Neste sentido, faz-se necessário investigar potenciais mecanismos de ação e vias de sinalização envolvidas no efeito neuroprotetor dos compostos presentes no extrato. Além disso, a cumarina, o componente majoritário do EDAC, foi indicado como

possível agente farmacologicamente ativo, no entanto, ainda não foram realizados ensaios biológicos em modelos de AVE com este composto isolado.

Sendo assim, o presente projeto de pesquisa buscará investigar as vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação dos compostos presentes no EDAC e o possível efeito protetor da cumarina isolada em modelos *in vitro* de AVE. Além disso, analisará a regulação da expressão de marcadores de astrogliose e de proteínas da via MAPK e AKT em células do sistema nervoso central sob estresse induzido pela excitotoxicidade glutamatérgica.

2. Revisão de literatura

2.1. Acidente Vascular Encefálico

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), conhecido popularmente como derrame cerebral, é uma condição patológica caracterizada pela redução ou bloqueio do fluxo sanguíneo, levando a insuficiência do suprimento de sangue para o tecido cerebral. O AVE pode ser dividido em hemorrágico e isquêmico. O hemorrágico é causado pela ruptura de um vaso levando ao extravasamento do sangue. O isquêmico, por sua vez, ocorre pela obstrução do fluxo devido a presença de um coágulo (Sociedade Brasileira de AVC, 2023).

A isquemia pode ocorrer no encéfalo, na medula espinhal e também na retina. Durante a obstrução do vaso, o tecido encontra-se ausente de oxigênio e nutrientes. A durabilidade dessa condição irá definir a gravidade da isquemia. Sendo uma interrupção temporária, chamado de Ataque Isquêmico Transitório (AIT), o dano gerado é menor que uma interrupção do fluxo mais duradoura. Quanto mais tempo a oferta de sangue se manter reduzida, maiores serão as sequelas do paciente e menor a probabilidade de recuperação da área lesionada (Kuriakose & Xiao, 2020).

A região isquêmica é dividida em duas importantes partes, que desempenharão diferentes papéis para a lesão e no processo de recuperação. O núcleo isquêmico é o local no cérebro em que ocorreu a isquemia, como representado na Figura 1 pela região amarela. O local ao redor do núcleo isquêmico é chamado de penumbra (região azul). O dano causado no núcleo isquêmico é praticamente irreversível, enquanto na região de penumbra o dano pode ser reversível e até evitado com rápida reperfusão. A reperfusão é o retorno do fluxo sanguíneo após a desobstrução do vaso, renovando o suprimento de oxigênio e nutrientes para o tecido (Woodruff et al., 2011).

A reperfusão, no entanto, pode contribuir para o aumento do dano, levando a uma lesão chamada de isquemia-reperfusão (I/R) (Yapca et al., 2013). A I/R contribui para o dano celular como estresse oxidativo, inflamação, ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), podendo levar a processos de morte celular como apoptose, necrose e ferroptose (Wu et al., 2018). Desta forma, tem crescido o interesse por compreender as vias de sinalização envolvidas na lesão com o intuito de buscar antioxidantes e antiinflamatórios como o seu tratamento (M. Zhang et al., 2024).

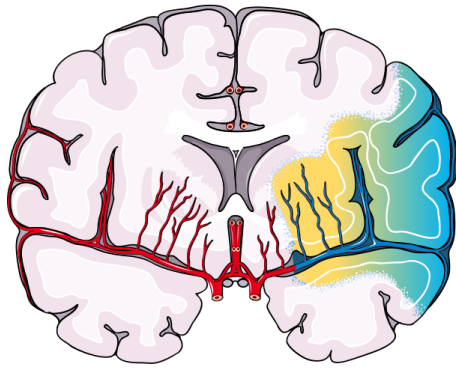


Figura 1. Regiões do cérebro isquêmico. Em amarelo o núcleo isquêmico, local em que ocorreu a isquemia. Em azul a região de penumbra.

O atendimento imediato ao paciente que sofreu um AVE pode minimizar consideravelmente possíveis sequelas. O tratamento atual consiste em trombólise intravenosa e/ou trombectomia endovascular. A trombólise é o procedimento que utiliza uma medicação (trombolítico) para a dissolução do coágulo, reduzindo a lesão se administrada entre 4 a 5h após a isquemia. A trombectomia é a remoção mecânica por cirurgia do coágulo, e pode ocorrer até 6h a 24h após a lesão. Com a rápida volta do fluxo sanguíneo (reperusão) se reduz consideravelmente as sequelas do paciente. Por isso, a importância do atendimento imediato (Tapuwa et al., 2015).

2.2. Epidemiologia

O *Global Burden of Disease (GBD)*, órgão gerenciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tem como objetivo fornecer dados estatísticos em escala global referente a todas as doenças que afetam a população (Feigin et al., 2021). Os últimos dados atualizados (abrangendo o período de 1990-2019) mostram o cenário mundial do AVE.

A incidência e prevalência para todos os tipos de AVE combinados, levando em conta todas as idades e sexos, mostram que há mais de 12,2 milhões de novos casos a cada ano. Mundialmente, uma em cada quatro pessoas com mais de 25 anos terá um AVE ao longo da vida. Os dados de prevalência mostram que existem mais de 101 milhões de pessoas no mundo vivendo atualmente que já tiveram AVE. A taxa de mortalidade indica que 6,5 milhões de pessoas morrem anualmente de AVE (World Stroke Organization, 2022).

Considerando apenas os casos de AVE isquêmico, as taxas de incidência mostram que existem mais de 7,6 milhões de novos casos a cada ano. Globalmente, mais de 62% de todos os AVE são isquêmicos. Mais de 77 milhões de pessoas vivem atualmente após terem um AVE isquêmico e 3,3 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência da doença (World Stroke Organization, 2022).

No Brasil, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde – DATASUS, mostrou que no ano de 2020 houve 99.010 mortes devido ao AVE, englobando todos os casos. Em 2022, de 1º de janeiro até 13 de outubro, 87.518 brasileiros foram a óbito. Estes dados tornaram o AVE a maior causa de morte no país

(Sociedade Brasileira de AVC, 2023). De acordo com a Secretaria da Saúde do Estado da Bahia (SESAB), na Bahia, 6 mil pessoas morrem por AVE, sendo duas mil em Salvador por ano (SESAB, 2018).

Categorias	Mortalidade no Brasil		
	2001	2011	2021
Faixa Etária			
1 a 19 anos	55	50	28
20 a 59 anos	8.167	6.194	4.415
60 a 80+ anos	35.384	38.644	31.354
Sexo			
Masculino	22.548	22.912	18.225
Feminino	21.113	21.998	17.582
Raça			
Branca	22.528	21.060	15.938
Preta	3.943	4.338	3.788
Parda	10.493	16.312	14.887
Indígena	55	84	129

Tabela 1. Número de morte por AVE no Brasil. Dados coletados no Datasus a partir do CID10 - I64 - Acidente Vascular Cerebral, Não Especificado Como Hemorrágico Ou Isquêmico.

Sendo o AVE a maior causa de morte no Brasil, como já descrito acima, espera-se que os gastos públicos para tratamento sejam elevados. Estudo realizado em 2009 demonstrou um custo estimado de US\$ 122.4 milhões para AVE hemorrágico e US\$ 326.9 milhões para AVE isquêmico somando gastos nacionais dos serviços de saúde (Christensen et al., 2009). Outro estudo de 2019 feito em Santa Catarina, com 274 pacientes, avaliou um gasto anual de US\$ 1.095.118 para o governo com esses pacientes (Safanelli et al., 2019). Estes dados reforçam a relevância de pesquisas para prevenção e tratamento da doença no país.

2.3.Fisiopatologia do AVE

A ciência tem buscado tratamentos eficazes para a recuperação tecidual cerebral após um AVE isquêmico. No entanto, para propor novas opções terapêuticas é preciso entender os mecanismos de morte celular que ocorrem após a isquemia. Alguns eventos fisiológicos possuem destaque, incluindo eventos a nível vascular, celular e molecular que coexistem após o AVE. A ativação desses mecanismos irá depender da condição fisiológica individual de cada paciente e da extensão da lesão infartada (Sekerdag et al., 2018).

Os componentes da unidade neurovascular (UNV) são os primeiros afetados após o AVE. Estes são as unidades estruturais que compõem a funcionalidade e integração dos vasos sanguíneos no sistema nervoso central (SNC). São eles: as células endoteliais, os pericitos, lâmina basal, astrócitos, micróglia pericapilar e neurônios (Fig.2) (Sweatt,S.K,

et al., 2016). Em condições saudáveis, as UNV garantem a homeostase cerebral, regulam o fluxo sanguíneo, modulam a troca de moléculas através da barreira hematoencefálica (BHE) e contribuem na vigilância imunológica. Na condição de AVE, essas células reduzem sua capacidade de reparo após ruptura da BHE, levando à perda na regulação do fluxo sanguíneo, estresse oxidativo, inflamação e conseqüentemente perda da conexão neuronal e disfunção encefálica (Posada-Duque et al., 2014).

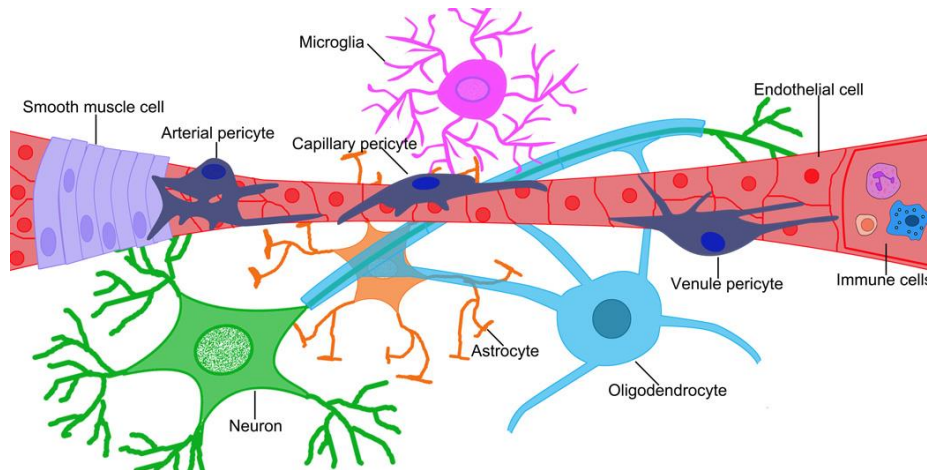


Figura 2. Células do sistema nervoso central (SNC). Esquema mostrando o vaso sanguíneo em vermelho, formado pelas células endoteliais. Os pericitos em azul escuro e demais células do SNC. Imagem extraída de: (Sweatt, S.K, et al., 2016).

A nível celular, os danos gerados pela isquemia podem ativar diferentes mecanismos de morte celular que incluem apoptose, necrose e autofagocitose. Estes mecanismos são ativados como resultado de eventos moleculares que resultam em inflamação (Iadecola et al., 2012), estresse oxidativo pela produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (van der Burgh & Boes, 2015), influxo de cálcio (Bano & Nicotera, 2007) e redução da produção de ATP (Xu et al., 2005).

Momentos depois de um AVE, uma série de mecanismos indutores de morte celular são ativados. Dentre eles está a excitotoxicidade (Lee et al., 2018). Após a diminuição da oferta de oxigênio e glicose, consequência da redução do fluxo sanguíneo, ocorre falha na bomba de Na^+/K^+ comprometendo a produção de ATP. Sem a produção de ATP, o Ca^{2+} , que normalmente é mais concentrado fora do que dentro da célula, sofre um influxo, tornando-se mais concentrado dentro da célula. O Ca^{2+} intracelular em excesso irá, então, se ligar as sinaptotagiminas, proteínas localizadas nas vesículas que transportam o glutamato dentro da célula, permitindo sua fusão à membrana e liberando o glutamato na fenda sináptica. O excesso de glutamato na fenda sináptica irá hiper excitar os receptores de glutamato NMDA e AMPA dos neurônios pós-sinápticos, levando ao influxo de cálcio nessas células e conseqüente ativação de morte celular (Szydłowska & Tymianski, 2010).

2.4. Vias de sinalização envolvidas no AVE

2.4.1. PI3K/AKT

Os mecanismos de morte celular acionados, após isquemia cerebral, já foram bem discutidos até aqui. No entanto, vale descrever também as respostas compensatórias celulares que buscam a homeostase e sobrevivência celular pós-AVE. O baixo nível de oxigênio e glicose também irá induzir respostas benéficas como: neurovascularização, angiogênese, expressão de mediadores neurotróficos e regulações metabólicas através da ativação de vias que culminam em proteção dos neurônios contra a morte celular (Greenberg & Jin, 2005).

A via de sinalização PI3K/AKT é conhecida por regular atividades celulares que garantem a sobrevivência celular. Essas proteínas pertencem a família das quinases e são capazes de fosforilar o grupo 3'-OH do anel Inositol em fosfolipídeos na membrana plasmática. A AKT é considerada uma das principais proteínas da via, que é capaz de fosforilar outras proteínas e assim regular sua ativação, influenciando em mudanças na resposta inflamatória e apoptose na célula (Cantley, 2002).

O fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) é um fator de transcrição que tem um importante papel de neuroproteção em condições de hipóxia, sendo regulado por PI3K/AKT, que promove o aumento da expressão de HIF-1 em condição de hipóxia. Uma das formas de HIF-1 proteger os neurônios é promovendo o transporte de oxigênio induzindo a expressão de proteínas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e eritropoetina (EPO), proteína que controla a eritropoiese (produção de eritrócitos). Outras formas são através da regulação do metabolismo da glicose e prevenção de apoptose através da inibição da liberação de citocromo c e inibição de ativação de caspases (Z. Zhang et al., 2018).

Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, Fator de crescimento nervoso (NGF) e Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também podem ativar PI3K/AKT. Um dos alvos da AKT fosforilada (p-AKT) é a proteína Bad (proteína pró-apoptótica da família Bcl-2). A fosforilação de Ser136 em Bad previne sua associação e consequente inativação com proteínas Bcl-2, suprimindo sua atividade apoptótica. A via PI3K/AKT também pode ser ativada promovendo sobrevivência neuronal (Figura 4) (Rai et al., 2019).

Um estudo pré-clínico demonstrou que o peptídeo obestatina, um hormônio, foi capaz de inibir a apoptose em células PC12, através da regulação de proteínas como Bcl-2 e caspase-3, em condição de isquemia. AKT e ERK1/2, outra proteína quinase associada a sobrevivência neuronal, mostraram garantir a sobrevivência celular em resposta à obestatina. A ativação de ERK1/2 levou a inibição da caspase 9 e consequente inibição de caspase 3. Já a AKT regulou a atividade transcricional de FOX-O1, fator de transcrição importante para a gliconeogênese, que quando superexpresso ativa apoptose. A AKT foi capaz de inibir a FOX-O1 impedindo a formação do apoptossoma e ativação de caspases, inativando a apoptose (Sánchez-Temprano et al., 2022).

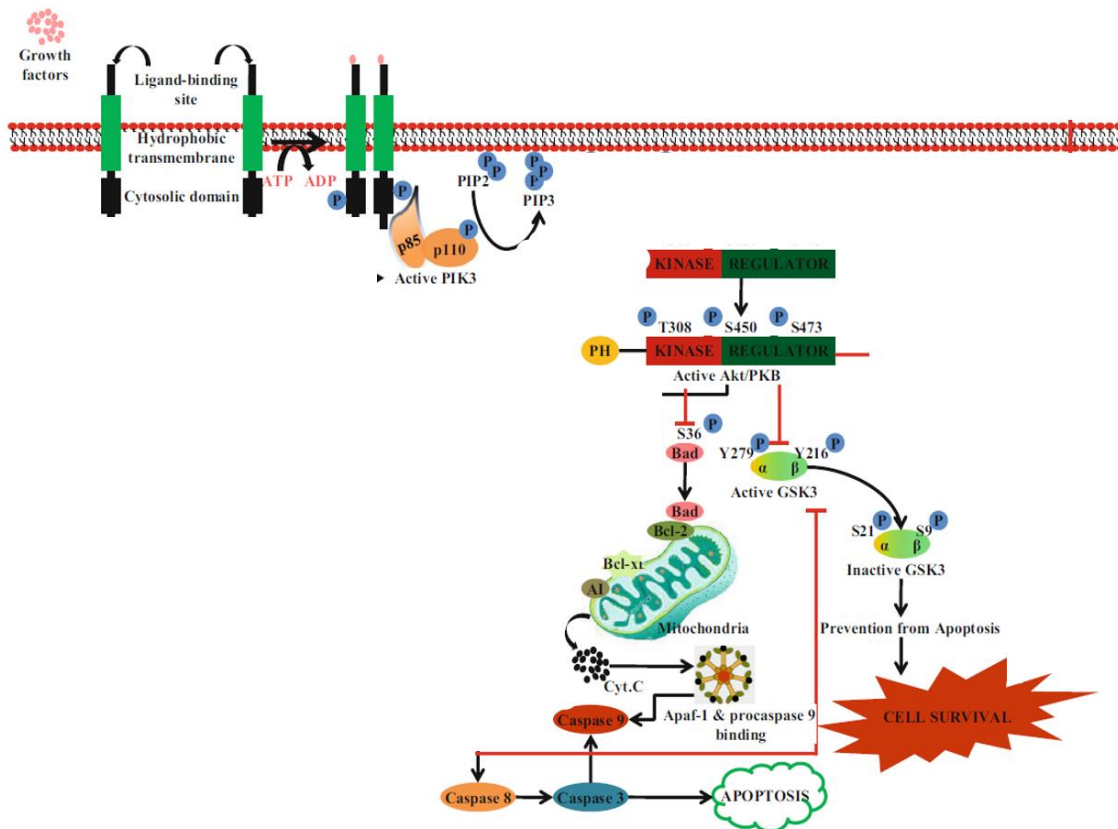


Figura 3. Representação da via PI3K/ AKT após isquemia. Imagem adaptada e extraída de: (Rai, et al., 2019).

2.4.2. Proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPK)

As proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPK) são uma família de proteínas responsáveis pela transdução do sinal de receptores de superfície celular para o núcleo. Alguns estímulos extra e intracelulares são capazes de ativar a via Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Esta última, conhecida como proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), ao ser ativada, transloca-se para o núcleo induzindo a expressão ou ativando proteínas associadas a regulação de proliferação celular, diferenciação, apoptose, dentre outros (Figura 5). Entre os estímulos que podem ativar essa cascata de sinalização estão os fatores de crescimento, alguns neurotransmissores, processos inflamatórios e a condição de hipóxia (Kong et al., 2019).

Ao receber o sinal extracelular, como a diminuição de oferta de oxigênio, os receptores de membrana são estimulados ativando tirosina quinase. Este sinal é transmitido para Ras. Ras liga-se a Raf que ativa MEK em sequência. MEK ativa ERK1/2 que irá fosforilar proteínas alvo ou entrar no núcleo e fosforilar fatores de transcrição que irão levar a expressão de proteínas que regulam o metabolismo celular, podendo estar tanto associada a proliferação celular, quanto também a apoptose. Isto confere um caráter dúbio da ativação das MAPK, dependendo do modelo de estudo elas podem prevenir ou contribuir para a morte celular (Figura 5) (Lahiani et al., 2018).

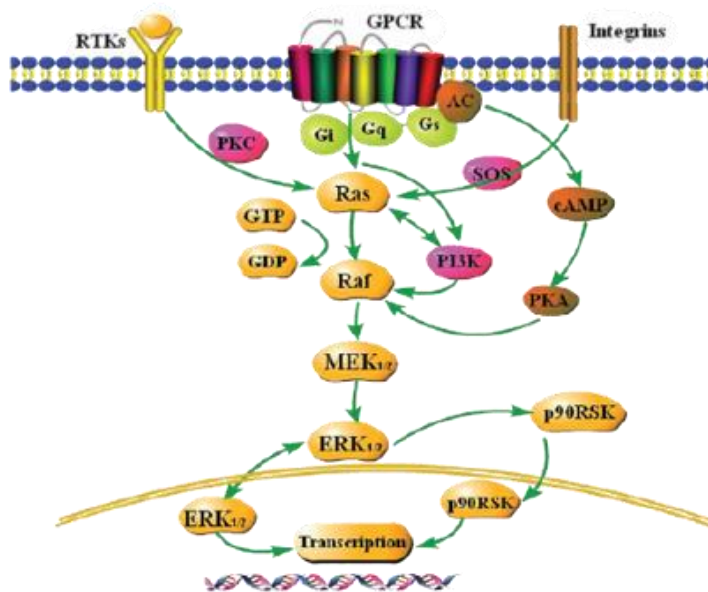


Figura 4. Representação da via MAPK. Imagem extraída de: (Kong, et al., 2019).

Para entender o papel da MAPK na indução de apoptose em condição de estresse oxidativo, Jiang e colaboradores (2005) utilizaram células PC12 normais e células PC12 modificadas que expressavam um mutante negativo de Ras. Estas células mutantes foram submetidas ao tratamento na presença e ausência de H₂O₂. A morte celular foi analisada por alguns ensaios, dentre eles o de expressão de caspase 3. Ambas as células mostraram morte celular apoptótica, porém de forma mais intensa naquelas que tinham o mutante da Ras. Juntamente com um inibidor de MAPK quinases, observou-se que essas culturas aumentaram os níveis de caspase 3. Os resultados mostram que a via das MAPK são importantes na mediação contra a morte celular apoptótica frente a um dano por estresse oxidativo em células PC12 (Jiang et al., 2005).

Estudo *in vitro* com células PC12 expostas a condição de privação de oxigênio e glicose por 3 horas seguidas de reperfusão por 18 horas mostrou morte celular por mecanismos como liberação de lactato desidrogenase (LDH), liberação de citocromo c, ativação de Bax e caspase 3, dentre outros. A condição de OGD sem reperfusão, mostrou forte ativação de MAPK, JNK e p-38. A homocarnosina, um peptídeo neuroprotetor endógeno, foi capaz de reduzir LDH e caspase 3 e também reduzir a ativação de ERK1/2. Esses resultados sugerem que a homocarnosina atua como um antioxidante prevenindo a morte neuronal por inibição de apoptose e atenuando a ação diferencial de MAPKs (Tabakman et al., 2002).

O resveratrol, antioxidante encontrado nas uvas, foi capaz de interagir com a via das MAPK em modelo de cultura primária de astrócitos do hipocampo expostas a LPS. Através da presença de um inibidor de MEK/ERK foi mostrado que o resveratrol melhorou a ação do inibidor, demonstrando que sua inativação desencadeia um efeito anti-inflamatório (Bellaver et al., 2015).

Outro estudo avaliou a capacidade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora de compostos da *A. cearensis* (cumarina, ácido vanílico e amburosídeos) e do extrato

seco (DEAC) em células de linhagem microglial BV-2 expostas ao lipopolissacarídeos (LPS). Além disso, avaliou-se os mecanismos moleculares de ação do extrato, avaliando a expressão de proteínas da via MAPK (JNK e ERK1/2), dentre outras. Os achados demonstraram que os compostos e DEAC foram neuroprotetores e que o DEAC suprimiu a ativação de JNK e ERK1/2 nas células BV-2 ativadas por LPS, identificando esta via como provável mecanismo de ação para gerar o efeito anti-inflamatório observado (De Araújo et al., 2022).

2.4.3. Apoptose

A morte celular programada, ou apoptose, é acionada logo em seguida ao infarto encefálico. Normalmente, esse evento ocorre na penumbra, região onde as células estão mais preservadas e ainda há oferta suficiente de energia. A ativação da apoptose ocorre pela presença em excesso de radicais livres, fator de necrose tumoral (TNF), diminuição de expressão de fatores de crescimento e neurotrofinas, danos ao DNA, disfunção mitocondrial, etc (Mehta et al., 2007). Como descrito acima, durante a isquemia, a excitotoxicidade glutamatérgica e também a acidose láctica permitem a entrada de cálcio através da estimulação de receptores como NMDA e AMPA. Como consequência, as calpaínas, proteases de cisteínas dependente de cálcio, clivam o agonista de morte de domínio de interação BH3 (Bid) em sua forma truncada (tBid) (Figura 3). Esta, uma proteína pró-apoptótica, irá ser translocada para a membrana mitocondrial, onde irá interagir com outras proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, que são Bax, Bak, Bad e Bcl-XS. Estas proteínas irão induzir a liberação de citocromo c contribuindo para a formação do apoptossoma. Em seguida, a procaspase-9 é ativada, iniciando uma cascata de ativação de caspases, que incluem clivagem de caspase 3, 6 e 7. Estas caspases irão levar a uma degradação do DNA e conseqüente morte celular (Figura 3) (Datta et al., 2020).

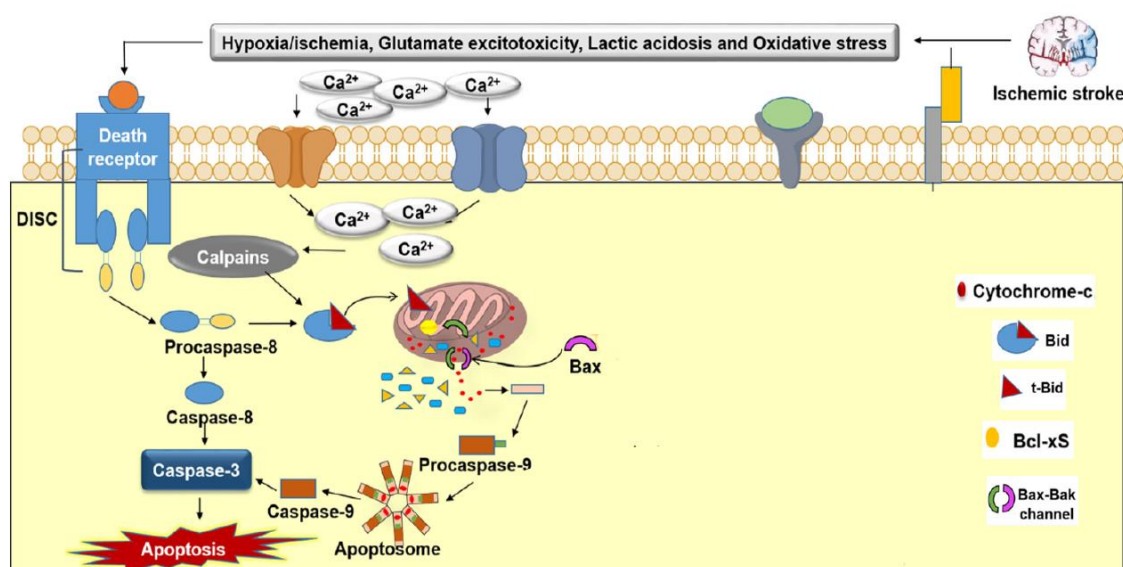


Figura 5. Representação da via de apoptose após isquemia. Imagem adaptada e extraída de: (Datta, et al., 2020).

Em modelo de estudos pré-clínicos de isquemia cerebral, alguns compostos naturais foram capazes de impedir a apoptose atuando sob proteínas pró-apoptóticas.

Em estudo avaliando o efeito neuroprotetor da berberina, um alcaloide presente em ervas medicinais, em modelo de excitotoxicidade glutamatérgica, mostrou que o composto foi capaz de proteger células PC12 e N2a contra o dano gerado pelo glutamato. As células PC12 e N2a foram pré-tratadas por 2h com berberina (50-1000 μ M) e em seguida expostas ao glutamato (10mM) por 24 horas. Ao avaliar a expressão de caspase-3 clivada e Bax/Bcl-2, foi demonstrado que a berberina em baixas concentrações foi capaz de reduzir a superexpressão dessas proteínas pró-apoptóticas que havia sido induzida por glutamato, evidenciando sua ação anti-apoptótica (Sadeghnia et al., 2017).

O extrato de folhas de *Ginkgo biloba* L. (GBE), utilizado como medicamento na China para doenças cardiovasculares (AVE e infarto do miocárdio), indicou em estudo pré-clínico ser capaz de inibir apoptose neuronal em camundongos pós-AVE. O estudo *in vivo* mostrou, através de imuno-histoquímica, que o extrato foi capaz de inibir a ativação de caspase-3 no hipocampo após AVE isquêmico. Por Western Blot, demonstraram que o extrato foi capaz de regular a expressão de Bax e Bcl-2 e reduzir a expressão de caspase-3 clivada, produzindo um efeito anti-apoptótico (Li et al., 2021).

2.5. Potencial terapêutico de compostos de semente de *Amburana Cearensis* contra AVE

Conhecida popularmente como “umburana”, “cumaru” ou “cerejeira”, a *Amburana cearensis* A.C. Smith é uma planta que pode ser encontrada no nordeste brasileiro, especificadamente na Caatinga. Usada frequentemente na medicina popular, com destaque no seu uso pelos povos indígenas, o chá feito a partir das folhas ou semente da *Amburana*, mostra ser capaz de suavizar sintomas de asma, bronquite, tosse e dor de cabeça. Diversos estudos tem demonstrado potencial de atividade farmacológica de metabólicos secundários provenientes da *Amburana*, incluindo efeito neuroprotetor (Silva et al., 2020).

Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e colabores, foram desenvolvidos extratos a partir das sementes de *A. Cearensis*. Os extratos foram: extrato etanólico das sementes de *A. cearensis* (ETAC), extrato hexânico das sementes de *A. cearensis* (EHAC), extrato diclorometano das sementes de *A. cearensis* (EDAC) e extrato acetato de etila das sementes de *A. cearensis* (EAAC). Entre os compostos orgânicos presentes nesses extratos, identificados a partir de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), foram descritos alguns com conhecidas propriedades antioxidantes, como: cumarina, metil hexadecanoato, metil octadecanoato, etil hexadecanoato, γ -sitosterol, etc, sendo a cumarina o que apresentou a maior concentração (Tabela 2) (Pereira et al., 2017).

No artigo de Pereira e colaboradores (2017), foi demonstrado o perfil químico dos extratos EHAC, EDAC e EAAC além de seu potencial neuroprotetor. Células PC12 foram expostas ao glutamato (1mM) por 6 horas e então tratadas com diferentes concentrações dos extratos (0,01-2000 μ g/ml) por 24 e 72 horas. Por fim, foi analisada a viabilidade celular através do teste de MTT. Todos os extratos foram capazes de

proteger as células PC12 contra o dano gerado pelo glutamato, com exceção do EHAC nas concentrações maiores que 1000 µg/ml após 72h de tratamento.

Table 1

Compounds identified by GC-MS in extracts ETAC, EAAC, EDAC and EHAC from *Amburana cearensis* seeds.

	ETAC	EDAC	EAAC	EHAC
Coumarin	1.1 ± 0.1 (b)	14.9 ± 1.0 (a, c, d)	1.0 ± 0.0 (b)	1.1 ± 0.0 (a, b)
Methyl hexadecanoate	1.8 ± 0.0 (b, c, d)	5.4 ± 0.2 (a, c, d)	1.0 ± 0.1 (a, b, d)	4.1 ± 0.1 (a, b, c)
Methyl 9-cis-11-trans-Octadecanoate	1.0 ± 0.0 (b, c, d)	6.9 ± 0.3 (a, c, d)	Nd	2.9 ± 0.2 (a, c, b)
Methyl 13-trans-octadecanoate	1.0 ± 0.1 (b, c, d)	11.0 ± 0.7 (a, c, d)	1.0 ± 0.1 (a, b, d)	6.3 ± 0.2 (a, b, c)
Methyl octadecanoate	2.3 ± 0.1 (b, d)	3.9 ± 0.7 (c, d)	1.0 ± 0.1 (a, b, d)	2.8 ± 0.1 (a, b, c)
γ-Sitosterol	1.5 ± 0.0 (b, c, d)	1.1 ± 0.3 (c, d)	Nd	6.1 ± 0.4 (a, b, c)
Ethyl hexadecanoate	Nd	56.8 ± 2.4 (a, c, d)	Nd	1.0 ± 0.0 (b)

Ethanollic (ETAC), hexane (EHAC), dichloromethane (EDAC) and ethyl acetate (EAAC) extracts obtained from seeds of *Amburana cearensis*. Data represent means ± s.e.m. Different letters indicate significant differences between samples and ETAC (a), EDAC (b), EAAC (c), EHAC (d) by one-way analysis of variance followed by Tukey–Kramer *post hoc* test ($p < 0.001$). Nd, not detected.

Tabela 2. Compostos identificados por GC-MS nos extratos ETAC, EAAC, EDAC e EHAC de Sementes de *Amburana cearensis*. Extraído de (Pereira et al., 2017).

As propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos extratos de *A. cearensis* também foram demonstradas em cultura primária de células de cerebelo expostas ao glutamato (10 µM) e tratadas com ETAC, EHAC, EDAC e EAAC. Também foi avaliado a atividade protetora em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, submetidas ao estresse oxidativo e tratadas com ETAC. Os resultados obtidos mostraram que o EHAC reduziu em 30% a viabilidade celular após 72h de tratamento. Por imunofluorescência foi identificada a expressão de glutamina sintetase, beta tubulina III, GFAP e IBA1 nas células tratadas com os extratos na mesma proporção do controle, após exposição ao glutamato. O ETAC mostrou ser capaz de proteger as mitocôndrias do estresse oxidativo ao reduzir a produção de ROS e influxo de cálcio (Pereira et al., 2017).

Em modelo de isquemia cerebral, Ferreira e colaboradores (2023) analisaram a atividade do EDAC em fatias cerebrais do hipocampo expostas ao glutamato ou submetidas à privação de oxigênio e glicose (OGD). As fatias foram expostas por 24h ao glutamato (1 ou 3mM) com e sem EDAC (0,1, 1 ou 10µg/ml) e avaliada sua viabilidade por iodeto de propídio (IP). Para a OGD, as fatias foram incubadas em líquido cefalorraquidiano artificial (Acsf) e expostas a privação por 1 hora, na presença de EDAC (1 ou 10µg/ml) ou DMSO (controle). Fatias também foram mantidas em condição de normóxia (OGN) para controle positivo. Ao fim, as fatias foram fixadas

para análise em microscópio confocal. Os resultados de IP mostraram, que o EDAC foi citoprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica em todas as concentrações testadas. Através de imunofluorescência, foi visto que o EDAC foi capaz de aumentar a expressão de transportadores de glutamato (GLAST e GLT1) e glutamina sintetase (GS) em astrócitos em ambos os modelos de estudo, garantindo a homeostase (Ferreira et al., 2023).

Combinados, esses resultados demonstram o potencial neuroprotetor e antioxidante dos extratos de *A. cearensis*. No entanto, é preciso compreender os mecanismos de ação dos compostos presentes nos extratos para melhor desenvolver medicamentos que possam ser aplicados para tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial da isquemia encefálica. Sendo a cumarina o metabólico secundário em maior concentração nos extratos, sugere-se que esta possa ser o composto responsável pela atividade neuroprotetora observada.

3. Hipótese

O EDAC e a cumarina isolada de sementes da *A. cearensis* regulam a expressão de proteínas da via MAPK e AKT em células de linhagem PC12 em modelo agudo de AVE isquêmico.

4. Objetivos

O objetivo geral deste projeto é investigar o mecanismo de ação do EDAC e da cumarina isolada na regulação de proteínas da via MAPK e AKT modelo *in vitro* de AVE isquêmico.

- 4.1. Objetivo específico 1: Avaliar o efeito protetor do EDAC e da cumarina isolada na viabilidade de células neurais em modelo de privação de oxigênio e glicose.
- 4.2. Objetivo específico 2: Avaliar o efeito protetor do EDAC e da cumarina isolada na viabilidade de células neurais em modelo de excitotoxicidade glutamatérgica.
- 4.3. Objetivo específico 3: Avaliar a expressão de proteínas da via MAPK e AKT em células neurais submetidas a dano isquêmico agudo.

5. Material e métodos

5.1. Preparação do Extrato Diclorometano de *Amburana Cearensis* (EDAC), isolamento e caracterização da Cumarina

Após triagem, o material foi pesado, empacotado em papel Kraft e encaminhado à estufa de ventilação forçada para desidratação durante 48h a temperatura de 45°C. Em seguida, o material seco foi triturado a pó em moinho de navalha. Após a moagem o material foi acondicionado em recipiente âmbar e mantido a temperatura ambiente.

A extração foi realizada de acordo com a ordem crescente de polaridade dos solventes utilizados: hexano e diclorometano.

O pó das sementes foi inserido em frasco com capacidade para 5L. Durante o processo de extração foram feitas três macerações para cada solvente independentemente. A troca dos solventes foi realizada por 3 vezes a cada 48h sendo o macerado homogeneizado a cada 24h. O recipiente contendo o macerado ficou protegido da luz sob temperatura ambiente. Ao final do processo de maceração, o material foi filtrado primeiramente em algodão hidrofílico e em seguida em papel filtro, concentrado em rotaevaporador a velocidade de 1,6g e temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Ao final do processo de extração, o material foi transferido para uma placa de Petri e acondicionado na capela de exaustão por três dias para secagem total. Uma vez seco o extrato foi acondicionado em frascos protegidos da luz e mantidos a temperatura de 4°C .

Durante o processo de maceração da semente da *A. cearensis* com o solvente diclorometano, o material macerado se mostrou em duas fases bem distintas. Uma fase líquida, o sobrenadante (um óleo de coloração amarela) e uma fase sólida (coloração esbranquiçada). A separação das fases foi realizada pelo processo de filtragem com papel filtro 80 gramas. Para a retirada completa do óleo e isolamento da cumarina foi realizada uma recristalização, a fase sólida foi submetida a baixa temperatura -4°C por 30 minutos seguido de nova filtragem. O produto final (fase sólida de coloração esbranquiçada) foi identificado como cumarina por ressonância magnética nuclear (RMN).

5.2. Cultura de células PC12

As células de linhagem PC12 são originárias de feocromocitoma da medula adrenal de ratos e exibem características de células semelhantes a neurônios. Estas células são frequentemente utilizadas em modelos de estudo de doenças neurodegenerativas para avaliação de atividade neurotóxica de substâncias através da análise de efeitos na sobrevivência celular e níveis de expressão de proteínas. (Wiatrak et al., 2020)

As células PC12 foram obtidas do banco de células ATCC. Foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, SP, Brasil) e suplementadas com glicose $1\mu\text{g/L}$, 10% de Soro Fetal Bovino, 5% de Soro Equino (Cutilab, SP, Brasil), 1% de penicilina e 1% de estreptomicina (Cutilab, SP, Brasil) e mantidas em placas de poliestireno de 100 mm (Kasvi, Campina, Brasil). Os plaqueamentos foram feitos em placas de 96 poços (10^4 células/poço) para ensaios de viabilidade celular, 24 poços (6×10^4 células/poço) para marcação de imunofluorescência e 6 (2×10^5 células/poço) poços para extração de proteínas. As células foram mantidas na estufa em uma atmosfera umidificada com 5% de CO_2 e 37°C .

5.3. Cultura primária de astrócitos

Culturas primárias de ratos Wistar foram realizadas de acordo com Diretrizes brasileiras para produção, manutenção e uso de animais para atividades de ensino e

pesquisa científica e o Código de Ética local Comitê de Experimentação Animal, número do protocolo (**6731220818**, ICS-UFBA).

As culturas primárias foram preparadas de acordo com Zhang et al. (2007). Os encéfalos de Ratos Wistar neonatos (p1) foram dissecados mecanicamente, após retirada da meninge, e filtrados. As células foram suspensas em meio DMEM (Gibco, SP, Brasil) suplementado com glicose 1µg/L, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina (Cutilab, SP, Brasil) e 10% SFB (Cutilab, SP, Brasil). Posteriormente foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10min. O sobrenadante foi despejado e as células foram ressuspensas em meio com soro. Foram mantidas em garrafas de cultura pré-revestidas com poli-D-lisina (20 µg/mL) e incubadas em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. Após 15 dias do lançamento foi coletado os astrócitos.

As garrafas foram tripsinizadas, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (33.000 células/poço) para ensaios de viabilidade celular e em 6 poços (10⁶ células/poço) para extração de proteínas. As placas foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

5.4. Preparo da solução de glutamato e solução estoque de EDAC e Cumarina e tratamento das células

A solução de Ácido L-glutâmico (Sigma RES5063G) foi preparada no dia do tratamento das células. Foi pesada a quantidade correspondente para o tratamento, dissolvido em meio DMEM com os soros formando uma solução mãe de 40mM e ajustado o seu pH para 7.0. Antes do tratamento, o meio contendo glutamato 40mM foi diluído para 20mM e filtrado. A solução estoque de EDAC e de cumarina foram preparadas diluindo-se em DMSO.

5.5. Ensaio de viabilidade por MTT em PC12

Após 24h do plaqueamento, o meio foi trocado e as soluções contendo EDAC ou cumarina foram adicionadas juntamente com o glutamato em meio com os soros. As células foram tratadas com EDAC e cumarina separadamente. O controle foi feito com meio puro e DMSO. As células PC12 foram mantidas por 24h na presença do EDAC, cumarina e/ou glutamato. As concentrações do EDAC e da cumarina foram 5, 50 e 500µg/ml. As concentrações de glutamato foram 5, 10 e 20mM.

O ensaio de citotoxicidade do EDAC e cumarina nas células PC12 foi determinada usando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma, St. Louis, MO). O teste MTT baseia-se no princípio de conversão de um substrato de cor amarela de cristais de formazan para uma cor violeta pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas (Mosmann, 1983). A solução de MTT foi diluída em meio DMEM e adicionada a cada poço na concentração final de 1µg/ml. As placas foram incubadas por 2h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. A seguir, para completar a dissolução dos cristais de formazan, as células foram lisadas com

100µl/poço de tampão de lise, contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% de dimetilformamida (DMF) em pH 4,7. Após 12h à temperatura ambiente, a absorvância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro a 595nm. Todos os experimentos foram repetidos seis vezes (n=6) para EDAC e cumarina, separadamente.

5.6. Ensaio de viabilidade por MTT em astrócitos

Após 48h do plaqueamento, foi realizada a modulação com glutamato, EDAC e cumarina. As placas com EDAC e cumarina foram tratadas separadamente. As concentrações do EDAC e da cumarina foram 5, 50 e 500µg/ml. As concentrações de glutamato foram 5, 10 e 20mM. Após 24h da modulação foi realizado o teste de viabilidade celular (MTT). O teste de MTT foi realizado da mesma maneira descrita acima para a PC12.

5.7. Imunofluorescência em células PC12

Para imunomarcção as células foram plaqueadas em placas de 24 poços em lamínulas estéreis previamente sensibilizadas com Poli-D-lisina por 30min em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. No dia posterior ao plaqueamento, as células receberam os tratamentos com glutamato (20mM), EDAC e cumarina (500µg/ml).

Após decorrido o tempo de tratamento, as células PC12 foram lavadas 3 vezes com solução de tampão fosfato (PBS) e fixadas com metanol gelado por 10min em temperatura de 20°C. No final da fixação, foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton diluído em PBS por 10min em temperatura ambiente e ao final, foi lavada 3 vezes com PBS. Em seguida foi realizada a etapa de bloqueio em solução contendo 10% de Soro de Cabra, 3% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,01% de Triton diluídos em PBS por 1h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi realizada a imunomarcção com anticorpo primário anti-caspase3 clivada de coelho (1:10, Abcam, AB3623) diluído em solução de bloqueio e incubado *overnight*. No dia seguinte, foi retirado o anticorpo e lavado 3 vezes com PBS por 5min em agitação lenta. Posteriormente, foi feita a marcação com anticorpo secundário de coelho Alexa Fluor 594 vermelho (1:500, Termo Fisher Scientific, A11012) diluído em solução de bloqueio e incubado por 2 horas no escuro em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, foi lavado 3 vezes com PBS e feita coloração de núcleos com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol (100µL por poço) por 5min. Foi lavado novamente com PBS e tirada as fotos em microscópio de fluorescência. Após as fotos, as lamínulas foram montadas na lâmina com líquido de montagem N-propil-galato 5% (5µL) e guardadas refrigeradas em geladeira. Os experimentos independentes foram feitos três vezes e analisados com software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, EUA).

5.8. Expressão de proteínas por Western Blotting em células PC12 e astrócitos de cultura primária

Para imunodeteção as células foram plaqueadas em placas de 6 poços e receberam tratamento com glutamato (20mM), EDAC e cumarina (500µg/ml) por 24h. Após o período de tratamento, o meio das células foi coletado e armazenado. As células, então, foram lavadas 3 vezes com PBS e extraídas em solução de tampão de extração contendo 200mg de SDS, 7,6mg de EGTA, 2,4g de ureia, 50µL de Triton X-100 e 1250µL de tampão Tris-HCl (pH 6,8), 100µL de NP40 e inibidores de protease (Sigma P8340) na concentração de 1µL/mL. A dosagem de proteínas foi adaptada de Lowry et al. (1951), método com um reagente de ensaio de proteína DC kit (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) (Lowry & Randall, 1951).

Para eletroforese foi usado gel de empilhamento de poliacrilamida a 10%. Para a proteína AKT foi depositado 30µg por poço de proteína e para as demais proteínas analisadas foi depositado 10µg por poço. A corrida da eletroforese foi realizada a 80V durante 30 minutos e depois 100V durante 2 horas. As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de polivinilideno de fluoreto (PVDF, Immobilon-P, Millipore), em 100 V por 1 hora. A carga proteica foi confirmada pela coloração das membranas com vermelho Ponceau S (Sigma P3504). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 1 h à temperatura ambiente em solução salina tamponada com Tris 20 mmol/L (pH 7,5), contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e leite em pó desnatado a 5%. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Glutamina Sintetase de coelho (1:10.000, Abcam, AB49873), anti-GFAP de coelho (1:1000, DAKO, Z0334), anti-ERK1/2 de coelho (1:1000, Santa Cruz, SC93), anti-AKT de coelho (1:1000, Santa Cruz, SC8312) e anti-phospho-p44/42-MAPK-ERK1/2-Thr202/Tyr204 (1:1000, Cell Signaling Technology, #9101) em solução de bloqueio durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (1:5000). Para controle de depósito foi usado o anticorpo primário anti-alfa tubulina de camundongo (1:1000, Santa Cruz, SC23948). Usou-se IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano como anticorpo secundário.

Para revelar as membranas, as bandas imunorreativas foram visualizadas por quimiluminescência registrada usando o Immune Start Substrato HRP - kit Bio-Rad no Image Quant LAS 500 (GE 29005063). A quantificação foi obtida por digitalização densitometria (ScanJet 4C, Hewlett Packard) de três experimentos independentes e analisados com software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, EUA).

5.9. Privação de oxigênio e glicose (OGD) e tratamento

A privação de oxigênio e glicose (OGD) foi adaptada de (Butt et al., 2017). Células de linhagem PC12 foram cultivadas em placas de 24 poços (6x10⁴ células/poço). No dia seguinte, o meio das células foi retirado e substituído por líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF). Este é composto de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 130,21mM, fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) (1,08mM), HEPES (8,56mM),

cloreto de potássio (KCl) (3mM), cloreto de cálcio (CaCl₂) (2,24mM), cloreto de magnésio (MgCl₂) (1mM), sacarose (2,76mM) para as células na condição de OGD e glicose (9,99mM) para as células em condições normais de oxigênio e glicose (OGN). O aCSF foi preparado no dia do tratamento e teve o seu pH ajustado para 7,3.

As células foram pré-tratadas com EDAC ou cumarina (500µg/ml) diluídos em aCSF-sacarose para OGD e aCSF-glicose para OGN. Outro grupo de células recebeu apenas com o aCSF, sem a presença dos tratamentos. Em seguida, as células foram expostas por 1h à condição de oxigênio e glicose normais (OGN) ou privação de oxigênio-glicose (OGD). As células em condições de normóxia foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células em OGD foram inseridas em uma câmara de hipóxia contendo 95% de nitrogênio (N₂) e 5% de CO₂ e mantidas em estufa a 37°C.

Após o período de 1 h, o aCSF foi retirado e as células em OGN e OGD receberam novamente meio DMEM com soro bovino e equino, contendo EDAC ou cumarina nas mesmas concentrações. Decorrido o período de 24h (reperfusão), foi analisada a viabilidade das células por iodeto de propídio (IP).

5.10. Ensaio de viabilidade celular por Iodeto de propídio

Esta técnica permite a identificação de células mortas devido a capacidade de interação do iodeto com as moléculas de DNA que ficam expostas quando a membrana celular é lisada após a morte da célula.

Para análise de viabilidade, após o período de 24 h, as células foram expostas ao IP (5 µL/mL) durante 30min em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido este tempo, as células foram fotografadas em Microscópio de Fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). O IP é capaz de absorver a luz no comprimento de onda de 536 nm e emite a 617 nm. Foram captadas 5 imagens de cada poço para análise no software ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, EUA). Neste software foi feita a contagem das células IP positivas que apresentaram capacidade de emitir fluorescência vermelha. Foi, então, obtida a porcentagem de células mortas e feita a média com n = 3.

5.11. Ensaio quantitativo de espécies reativas de oxigênio

Os níveis totais de ROS foram quantificados usando o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína. Este é um composto não fluorescente que, ao entrar na célula, é desesterificado e se torna 2',7'-diclorofluoresceína após oxidação, emitindo fluorescência (Mohammad, et al. 2019).

Células PC12 foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas concomitantemente com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 10µM e EDAC ou CUM (500µg/ml) durante 1 hora. Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 5min a 2000 rpm e ressuspensas em 1mL de PBS. A suspensão foi colocada em placas de 96 poços pretas contendo 195 µL de células e 5 µL do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (D6883, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µM. A

placa foi mantida em estufa por 30min e avaliada a fluorescência por espectrofotometria com excitação de 502 nm e emissão 523 nm.

5.12. Análises estatísticas

Os resultados de foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 8.0.1 (California, EUA) a partir das médias de cada grupo \pm SEM (erro padrão da média). Foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov e definido como paramétrico para todos os resultados. Em seguida, foi feito o teste One Way ANOVA seguido do teste de Tukey's para múltiplas comparações. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6. Resultados

6.1. Caracterização da cumarina

A cumarina foi identificada por ressonância nuclear magnética (RMN) de ^1H e ^{13}C (Figura 6). Este composto apresentou dois dupletos em 6,43 (d, 1H, 9,56 Hz) e 7,72 (d, 1H, 9,48 Hz) atribuídos a C2 e C3, respectivamente. Ele também mostrou dois duplos duplos a 7,49 (dd, 1H, 1,48 e 7,72) e 7,30 (dd, 1H, 1,12 e 7,64 Hz) atribuído a C5 e C6, respectivamente. Além disso, mostrou um duplete triplo em 7,54 (td, 1H, 1,2 e 8,68 Hz) atribuído a C7 e um tripleto duplo em 7,34 (dt, 1H, 0,44 e 8,36 Hz) atribuído a C8. ^1H e ^{13}C . Os sinais de RMN foram consistentes com a literatura (Wishart et al., 2009) e espectro de RMN ^{13}C de cumarina.

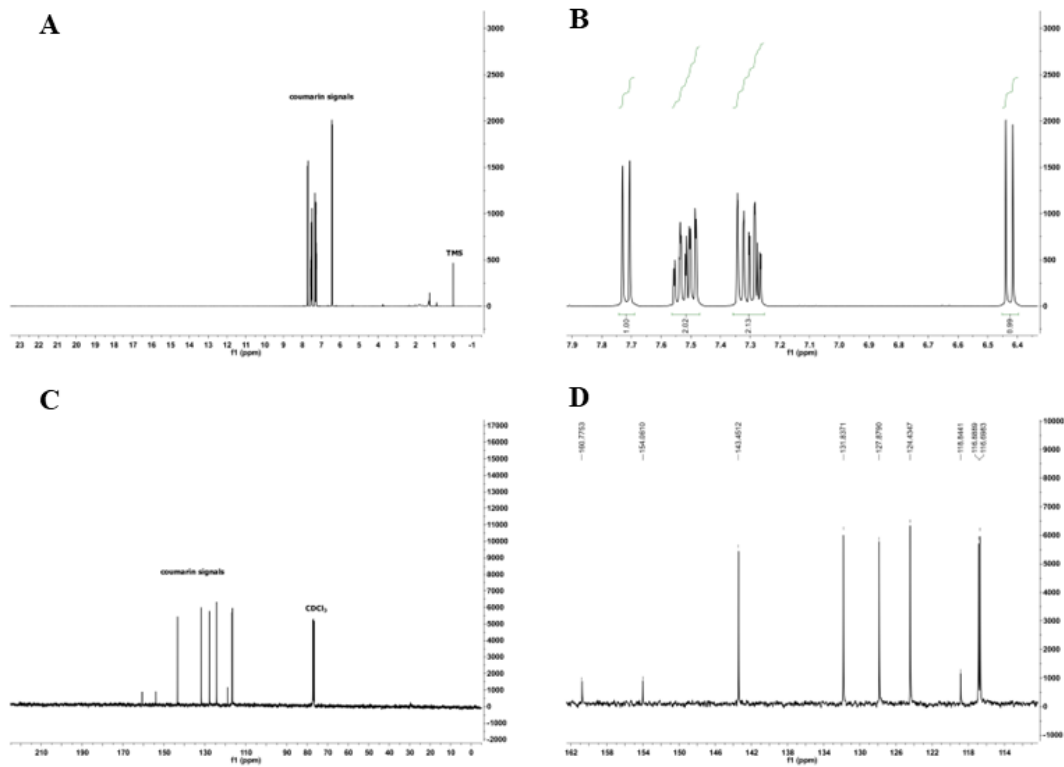


Figura 6. Caracterização química da cumarina isolada.

6.2. EDAC e cumarina protegem células PC12 contra dano induzido por privação de oxigênio e glicose (OGD)

As células PC12 foram expostas a condição de privação de oxigênio e glicose (OGD) e a condições normais de oxigênio e glicose (OGN) por 1h em a-CSF. Decorrido este tempo, o a-CSF foi substituído por meio de cultura com os tratamentos por 24h. Após o tempo de tratamento foi avaliada a viabilidade celular por incorporação de iodeto de propídio (IP). Observou-se (Figura 7) que após 1 hora as células em OGD ($9,6 \pm 2,3$) tiveram mais mortes que as células em OGN ($2 \pm 0,45$), demonstrando que a ausência de oxigênio e glicose leva à morte celular. Após as células receberem tratamento concomitante (EDAC pré) constatou-se que o EDAC pré OGD ($4,7 \pm 1,7$) apresentou diferença estatística quando comparado com o controle OGD ($9,6 \pm 2,3$) e nenhuma diferença estatística quando comparado com o controle OGN. O mesmo é observado no tratamento após a privação (EDAC pós) sendo de ($4,1 \pm 1,9$). Desta forma, concluiu-se que a concentração de $500\mu\text{g/mL}$ do EDAC foi capaz de proteger as células PC12 contra o dano induzido pela privação de oxigênio e glicose.

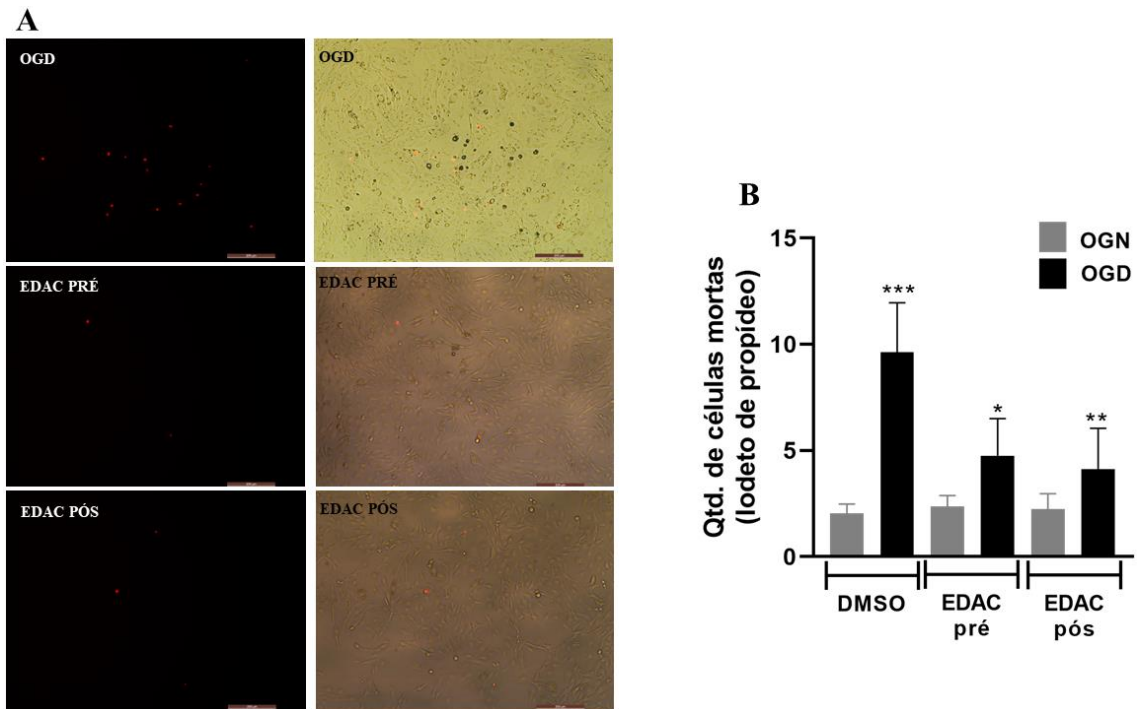


Figura 7. Efeito do EDAC na viabilidade celular de células PC12 submetidas a condição de privação de oxigênio e glicose (OGD) e condição normais (OGN). A) Fotomicrografias obtidas do microscópio de fluorescência invertido exibindo a marcação das células mortas por emissão de fluorescência vermelha para os diferentes grupos tratados. Aumento de 10x. B) Análise da quantidade de células mortas após 24h de tratamento. Em cinza representa-se as células em condições normais de oxigênio e glicose (OGN) e em preto as células em condições de privação de oxigênio e glicose (OGD). Células controle receberam DMSO, células tratadas receberam EDAC (500µg/ml) durante a privação (EDAC pré) e após a privação (EDAC pós). n=3.

O tratamento com cumarina (500µg/ml) demonstrou diminuição na morte celular no tratamento concomitante e no tratamento pós OGD (Figura 8). O tratamento concomitante (CUM pré) teve uma diminuição de morte celular de (5,7 ± 1,1) quando comparada ao controle OGD (9,6 ± 2,3). A redução observada foi ainda mais acentuada no tratamento com a cumarina após o dano (CUM pós), decaindo para (3,8 ± 0,51). Cumarina pré e pós OGD apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle OGD. Quando comparado com o controle OGN, CUM pré OGD apresentou diferença estatística e CUM pós OGD não apresentou. Desta forma, concluiu-se que a cumarina foi capaz de proteger as células PC12 contra o dano induzido privação de oxigênio e glicose.

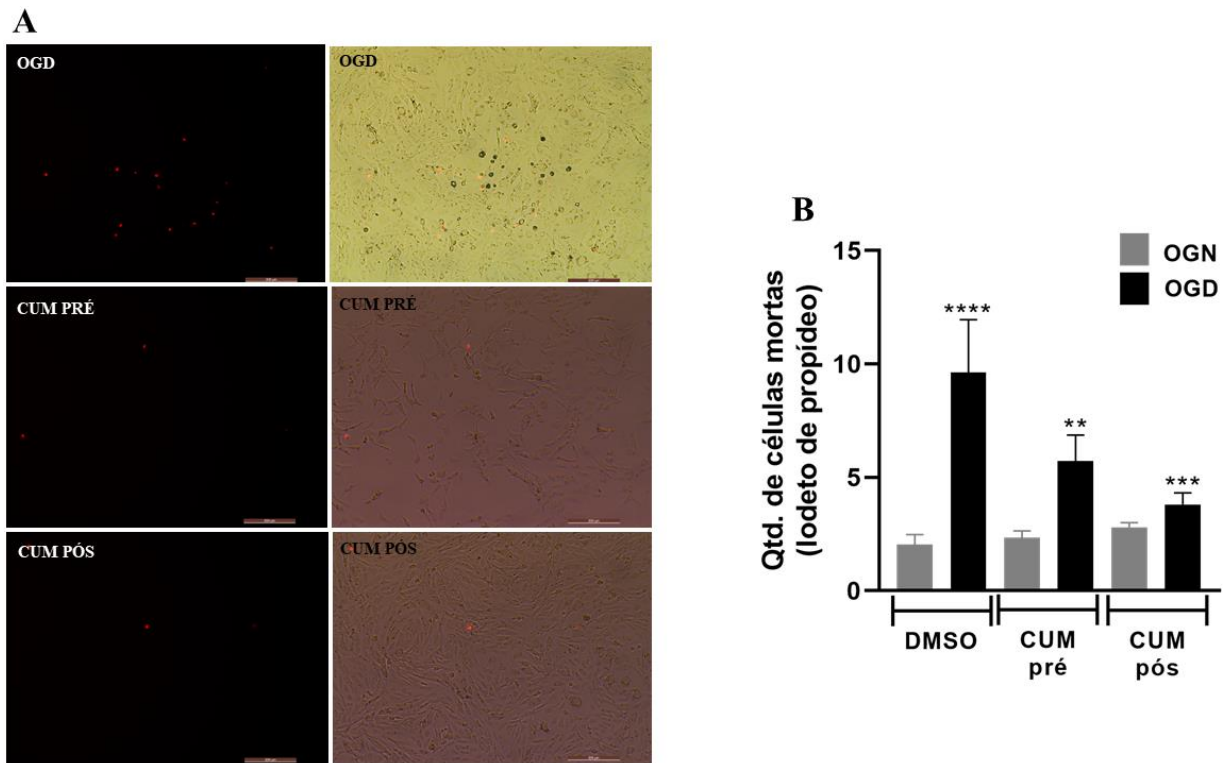


Figura 8. Efeito da cumarina na viabilidade celular de células PC12 submetidas a condição de privação de oxigênio e glicose (OGD) e condição normais (OGN). A) Fotomicrografias obtidas do microscópio de fluorescência invertido exibindo a marcação das células mortas por emissão de fluorescência vermelha para os diferentes grupos tratados. Aumento de 10x. B) Análise da quantidade de células mortas após 24h de tratamento. Em cinza representa-se as células em condições normais de oxigênio e glicose (OGN) e em preto as células em condições de privação de oxigênio e glicose (OGD). Células controle receberam DMSO, células tratadas receberam cumarina (500 μ g/ml) durante a privação (CUM pré) e após a privação (CUM pós). n=3.

6.3. Diferentes concentrações do glutamato são tóxicos para células PC12

A avaliação do efeito citotóxico induzido pelo glutamato nas concentrações de 5mM, 10mM, e 20mM sob a viabilidade das células foi determinado a partir do teste de MTT 24h após o tratamento em condições comparativas ao controle (meio puro com soro fetal bovino e soro equino). Os resultados demonstraram que o glutamato apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas, tendo (88,4% \pm 6,7) de células vivas na concentração de 5mM, (85% \pm 5,5) na concentração de 10mM e (82% \pm 9) na concentração de 20mM (Figura 9). Por isso, foi selecionada a concentração de 20mM para os ensaios de neuroproteção com o EDAC e a cumarina.

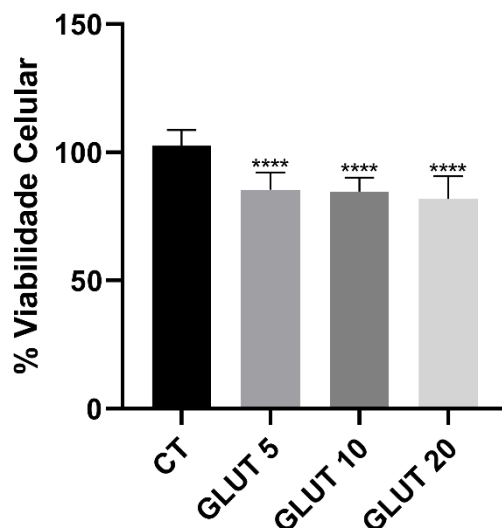


Figura 9. Efeitos do glutamato na viabilidade celular de células PC12. As células PC12 foram incubadas por 24h em meio contendo diferentes concentrações de glutamato (5-20mM). **** $p < 0,0001$ representa diferença estatística com o controle. N=3.

6.4. EDAC e cumarina não são tóxicos para células PC12

A curva de toxicidade para definir as concentrações de trabalho do EDAC e da cumarina foram feitas através da técnica de MTT após 24h de tratamento (Figura 10). Foram testadas as concentrações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g/ml}$ para o EDAC e para a cumarina. O controle recebeu apenas DMSO equivalente a maior concentração testada, totalizando em 0,05%. Os resultados demonstraram não haver diferenças significativamente estatísticas entre os grupos, indicando que nenhuma das concentrações testadas foi tóxica para as células PC12, tanto para EDAC quanto para cumarina.

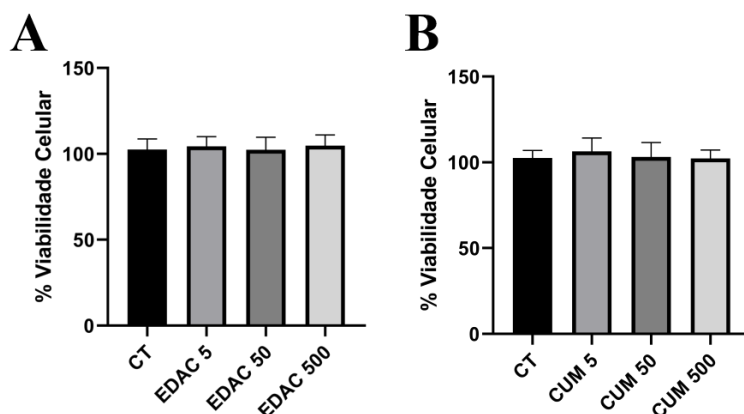


Figura 10. Efeitos do EDAC e da cumarina na viabilidade celular de células PC12. As células PC12 foram incubadas por 24h em meio com soro contendo diferentes concentrações de EDAC e cumarina (5-500 μg). A) Curva de toxicidade do EDAC. B) Curva de toxicidade da cumarina. N=3.

6.5. EDAC e cumarina protegem células PC12 contra excitotoxicidade do glutamato

Após 24h de tratamento concomitante do glutamato 20mM com EDAC e glutamato 20mM e cumarina (5-500 μ g) foi avaliada a viabilidade celular por teste de MTT (Figura 11). Observou-se que o glutamato 20mM teve diferença estatística quando comparado com o controle como demonstrado pela curva de toxicidade, reduzindo a viabilidade celular para (82% \pm 9). Para o EDAC, todas as concentrações foram capazes de proteger as células PC12 contra o dano induzido pelo glutamato demonstrando diferença estatística com o glutamato 20mM (#) e não mostrando diferença estatística quando comparado com o controle. A concentração de 5 μ g/mL mostrou viabilidade celular de (96% \pm 5). A concentração de 50 μ g/mL mostrou viabilidade celular de (97% \pm 4). Já a concentração de 500 μ g/mL garantiu às células uma viabilidade celular de (101% \pm 5). Desta forma, concluiu-se que todas as concentrações foram capazes de proteger as células PC12 contra o dano induzido pelo glutamato. Por ter o melhor resultado a concentração de 500 μ g/mL do EDAC foi escolhida para os ensaios de vias de sinalização.

A cumarina demonstrou diferença estatística quando comparado com o controle e com o glutamato 20mM em todas as concentrações. Desta forma, concluiu-se que a cumarina não foi capaz de proteger as células PC12 contra o dano induzido pelo glutamato em nenhuma das concentrações.

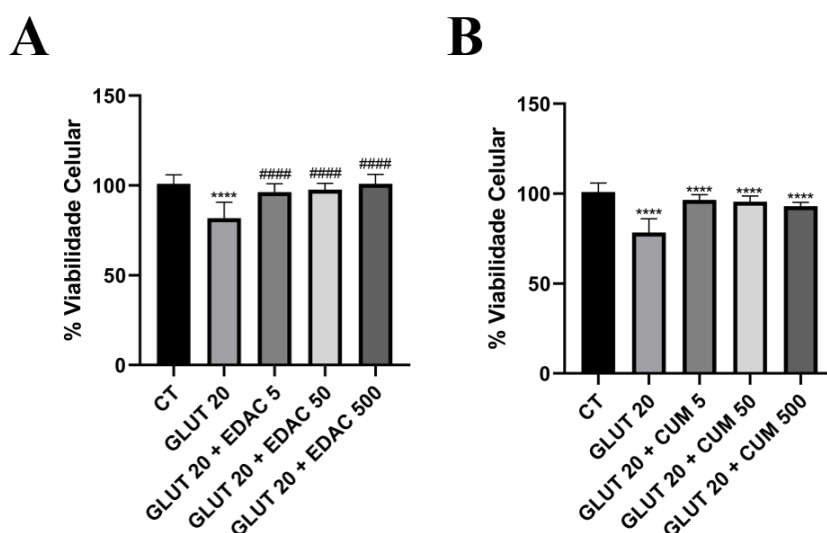


Figura 11. Efeitos do tratamento concomitante (glutamato + EDAC) e (glutamato + cumarina) na viabilidade celular de células PC12. A) Curva de neuroproteção do EDAC. B) Curva de neuroproteção da cumarina. ****p < 0,0001 representa diferença estatística com o controle e #####p < 0,0001 representa diferença estatística com o dano (glutamato 20mM) para o EDAC e cumarina. N=3.

6.6. EDAC e cumarina modulam a apoptose em células PC12 a partir do dano gerado por glutamato

Após decorrido 24h de tratamento, foi feita análise da expressão de caspase 3 em células PC12 através da técnica de imunofluorescência (Figura 12). Os resultados obtidos mostraram aumento (1635 ± 766) de fluorescência nos grupos tratados apenas com glutamato 20mM em comparação ao controle (48 ± 40). Os grupos tratados apenas com EDAC 500 μ g (91 ± 177) ou cumarina 500 μ g (122 ± 175), respectivamente, não apresentaram aumento significativo de expressão dessa proteína. Os grupos que receberam tratamento concomitante glutamato e EDAC (51 ± 91) e glutamato e cumarina (125 ± 212), por sua vez, apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo que recebeu o glutamato, e não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. Esses dados mostram que tanto o EDAC quanto a cumarina nas concentrações de 500 μ g/mL foram capazes de impedir a expressão de caspase 3 frente ao dano induzido pelo glutamato.

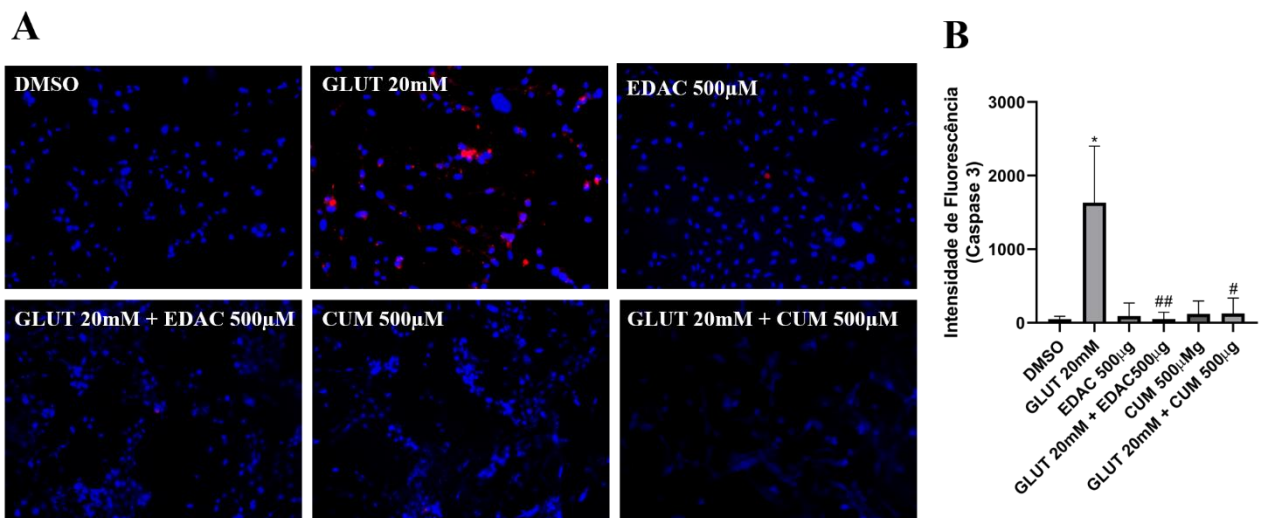


Figura 12. Imunofluorescência para caspase3 em células PC12. A) Representação da expressão de caspase3 (vermelho) e núcleo das células corados com DAPI (azul). B) Média de fluorescência de caspase3 nos grupos analisados. *p<0,04 representa diferença estatística com o controle e #p<0,02 e ##p<0,005 representa diferença estatística com o dano (glutamato 20mM). n=3

6.7. EDAC e cumarina aumentam a expressão de AKT em células PC12 a partir do dano gerado por glutamato

A avaliação da expressão proteica por Western Blotting (Figura 13) demonstrou que o glutamato (20 mM) aumentou a expressão de AKT em células PC12 após 24 horas de tratamento ($112\% \pm 18$) quando comparado com a condição de controle ($100\% \pm 0,5$). Em tratamento concomitante de glutamato e EDAC e glutamato e cumarina observa-se, em ambos, aumento da expressão de AKT em ($152\% \pm 43$) para EDAC e

(133% ± 16) para cumarina quando comparado ao grupo tratado com glutamato. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa.

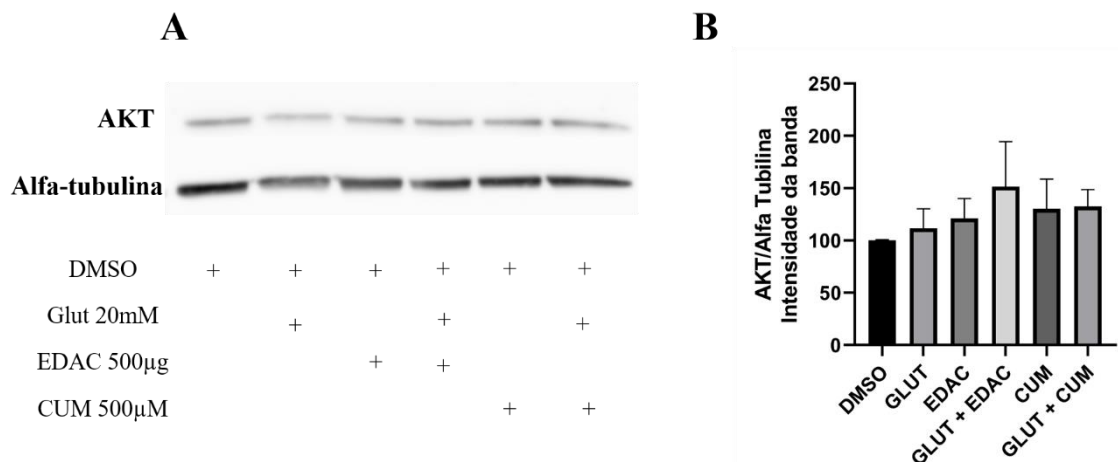


Figura 13. Western Blotting para detecção de AKT. A) Expressão das bandas de AKT e Alfa-tubulina (controle de depósito). B) Média de fluorescência das bandas de AKT. N=4.

6.8. EDAC e cumarina reduziram a expressão de ERK e p-ERK em células PC12 a partir do dano gerado por glutamato

Os dados de Western Blotting demonstraram que o glutamato (20 mM) aumentou a expressão de ERK (144 % ± 33) e diminuiu de p-ERK (98% ± 14) em células PC12 após 24 horas de tratamento quando comparado com a condição de controle de ERK e de pERK (100% ± 0) (Figura 14). Em tratamento concomitante de glutamato e EDAC observa-se diminuição da expressão de ERK para (96% ± 2,6) e de p-ERK em (20% ± 3). Para glutamato e cumarina observa-se diminuição da expressão de ERK em (62% ± 15) e p-ERK em (12% ± 7).

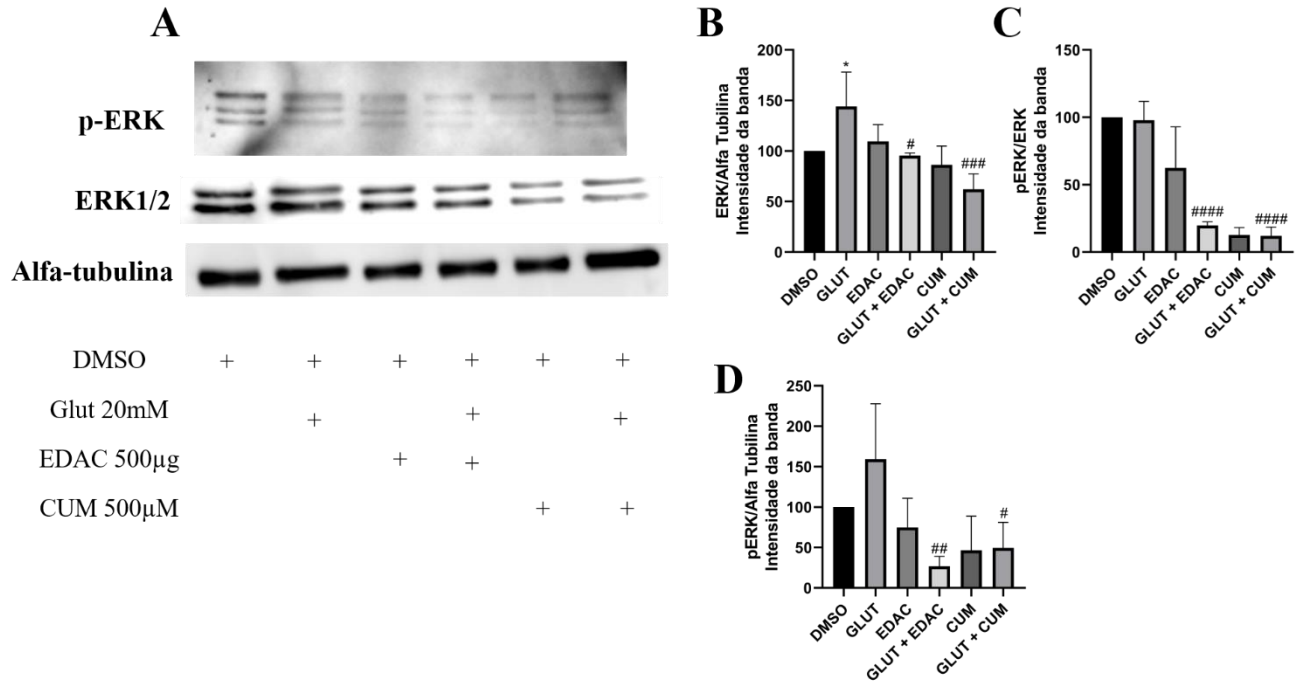


Figura 14. Western Blotting para detecção de ERK e p-ERK. A) Expressão das bandas de ERK1/2 e p-ERK. B) Média de fluorescência das bandas de ERK1/2 e Alfa-tubulina (controle de depósito). * $p < 0,03$ representa diferença estatística com o controle e # $p < 0,03$ e ### $p < 0,0001$ representa diferença estatística com o dano. C) Média de fluorescência das bandas de pERK e ERK1/2 (controle de depósito). #### $p < 0,0001$ representa diferença estatística com o dano. D) Média de fluorescência das bandas de pERK e Alfa-tubulina (controle de depósito). # $p < 0,02$ e ### $p < 0,005$ representa diferença estatística com o dano. N=4.

6.9.EDAC e cumarina diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células PC12 expostas a peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Foi observado que o peróxido de hidrogênio ($10 \mu M$) aumentou a produção de ROS ($114 \% \pm 26$) em células PC12 após 1 hora de tratamento quando comparado com a condição de controle ($97\% \pm 4$). Em tratamento concomitante de H_2O_2 e EDAC houve diminuição da produção de ROS ($93 \% \pm 11$) e cumarina ($90\% \pm 9$).

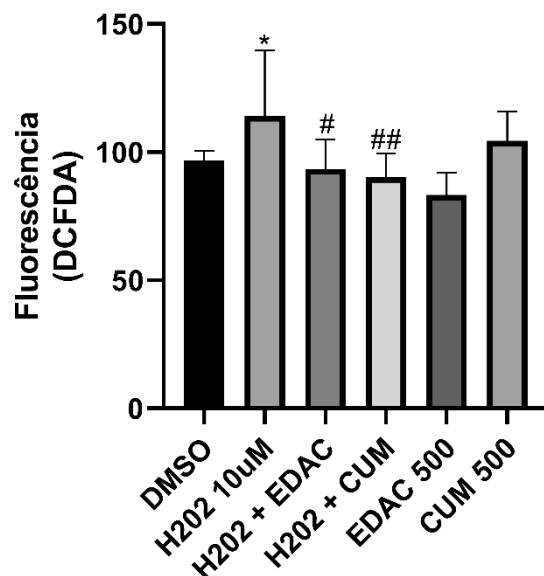


Figura 15. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células PC12. * $p < 0,0001$ representa diferença estatística com o controle e # $p < 0,0001$ ## $p < 0,0001$ representa diferença estatística com o dano (H_2O_2) para o EDAC e cumarina. N=3.

1. Discussão

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o EDAC é citoprotetor contra isquemia e excitotoxicidade do glutamato estimulando mecanismos homeostáticos do glutamato de astrócitos e protegendo oligodendrócitos em fatias cerebrais do hipocampo de ratos Wistar (Ferreira et al., 2023). No entanto, ainda não havia sido demonstrado quais compostos presentes no EDAC poderiam contribuir para o efeito protetor observado em modelos de privação de oxigênio e glicose. Para isto, utilizamos neste trabalho o modelo de OGD em células PC12.

Modelos de estudo utilizando células PC12 já demonstraram o potencial de compostos naturais em proteger estas células contra o dano induzido pela privação de oxigênio e glicose. O resveratrol na concentração de 10 μ M foi capaz de proteger células PC12 submetidas a 6h de OGD e 24h de reperfusão através da modulação de vias de sinalização mediadas por mitocôndrias (Liu et al., 2016). Outro estudo utilizando aloína mostrou que este composto natural foi capaz de inibir a apoptose de células PC12 submetidas a 4h de OGD e 24h de reoxigenação ao diminuir a expressão de Bax e caspase 3 e aumentar a expressão de Bcl-2 (Chang et al., 2016).

No presente trabalho demonstramos que tanto o EDAC quanto a cumarina isolada foram capazes de proteger células PC12 submetidas a 1h de OGD e 24h de reperfusão, ao serem tratadas concomitantemente com os compostos e também recebendo o tratamento após o dano. Sendo assim, evidenciamos o potencial neuroprotetor do EDAC e sugerimos a cumarina como o composto presente no EDAC

responsável por desencadear sua ação protetora em modelo de privação de oxigênio e glicose.

A toxicidade gerada pelo glutamato é um fator importante na fisiopatologia do acidente vascular encefálico (AVE) (Lee et al., 2018). Através do teste de viabilidade celular MTT, observou-se que o glutamato na concentração de 20mM, administrado durante 24 horas, foi capaz de diminuir aproximadamente 20% da viabilidade celular das células PC12, sugerindo uma indução de citotoxicidade. O mesmo foi observado em cultura primária de astrócitos, com uma viabilidade de 79,3% em culturas tratadas com 20mM de glutamato por 24 horas.

Estudos prévios em nosso grupo de pesquisa já demonstraram o efeito neuroprotetor do Extrato diclorometânico de *Amburana cearensis* (EDAC) contra a excitotoxicidade glutamatérgica em modelos de culturas de célula, como: PC12 (Pereira et al., 2017), cultura primária de cerebelo (É.P. Lima Pereira et al., 2017) e fatias de hipocampo (Ferreira et al., 2023). Nesta pesquisa, investigamos se a cumarina, composto majoritário no EDAC, era o principal agente indutor de proteção e, por sua vez, quais os possíveis mecanismos de ação envolvidos para gerar este efeito em cultura de linhagem PC12 e em astrócitos de cultura primária.

O EDAC (500µg/mL) foi capaz de inibir a morte celular gerada pelo glutamato em modelo de estudo em células PC12, com alto potencial neuroprotetor ao garantir 101% de viabilidade celular. A cumarina, por sua vez, não foi capaz de proteger as células. Sendo o extrato formado por outros compostos com potencial neuroprotetor, como hexadecanoato de metila (Mohimani et al., 2017) e γ -sitosterol (Sánchez-Martínez et al., 2022), observa-se uma maior proteção do EDAC em comparação a cumarina isolada. No entanto, outros experimentos realizados nesse projeto demonstraram uma possível ação protetor da cumarina, destacando-a como um importante agente do extrato com efeito protetor.

Em cultura primária de astrócitos o EDAC e a cumarina foram apenas capazes de aumentar sutilmente a viabilidade das células para glutamato e EDAC e para o glutamato e cumarina. No entanto, não houve diferença estatística. Sendo assim, não foi demonstrado potencial terapêutico nesta cultura.

A partir dos dados observados pelo EDAC e cumarina em células PC12, surge a necessidade de compreender quais os mecanismos de ação, ou seja, quais vias de sinalização podem estar sendo ativadas ou inibidas, e assim contribuindo para esse efeito neuroprotetor.

As caspases e a família Bcl-2 são reguladores com importante papel na apoptose neuronal em modelos experimentais de doenças excitotóxicas e isquêmicas. A caspase 3 quando ativada inicia a cascata de ativação das caspases, levando a morte celular (Jin et al., 2017). Para entender o mecanismo de proteção do EDAC e da cumarina, foi analisada a expressão de caspase 3 por imunofluorescência. Como mostrado na Figura 15, a caspase 3 foi aumentada em 1635% nos grupos expostos a 20mM de glutamato. Em contra partida, o nível de caspase 3 diminuiu significativamente nas culturas tratadas concomitantemente com glutamato e EDAC ou glutamato e cumarina.

Em estudos com células PC12, mostrou-se que a inativação da caspase 3 pode se dar através da supressão da regulação negativa de Bcl-2 e regulação positiva de Bax, além de impedir a liberação de citocromo c mitocondrial para o citoplasma, consequentemente inibindo a ativação das caspases (Cai et al., 2008). Sugerimos, então, este como um mecanismo utilizado pelo EDAC e cumarina para diminuir a morte celular causada pelo excesso de glutamato.

A via PI3K/AKT tem uma importante função de prevenção à morte neuronal tanto em condições hipóxicas como excitotóxicas. Após exposição ao glutamato, essa via é regulada negativamente. A ativação de AKT, no entanto, é capaz de suprimir proteínas pró-apoptóticas, como as da família Bcl-2, promovendo proteção contra danos gerados pelo glutamato (Chen et al., 2018), e consequentemente, atuar a nível mitocondrial impedindo a liberação de citocromo c e inativação de caspases (Teng et al., 2014).

O potencial antioxidante da cumarina já foi relatado em modelo de estudo de doenças neurodegenerativas (Fylaktakidou et al., 2005; Venugopala et al., 2013). Para investigar se esse composto poderia estar induzindo ativação de vias antioxidantes, utilizamos a técnica de Western Blot. Os achados desta pesquisa demonstraram que houve aumento de expressão de AKT em 152% para EDAC e 133% para cumarina concomitantemente expostas ao glutamato, no entanto, não houve diferença estatística significativa. Contudo, é importante destacar que a análise foi feita com a proteína total, e não a sua versão fosforilada e ativa. Sendo assim, sugerimos que a ativação de AKT pode influenciar no efeito neuroprotetor observado, mas é necessária a análise de sua forma fosforilada para confirmação.

Outro mecanismo utilizado pelo EDAC e cumarina para neuroproteção pode estar relacionado com a via das MAPK. Em estudo foi demonstrado o efeito protetor do extrato de acetato de etila (EAE) de raízes de *Arctium lappa L.* contra o estresse oxidativo induzido por glutamato em células PC12 através da diminuição da expressão de proteínas como Bcl-2/Bax e caspase 3. Ao avaliarem vias de sinalização antioxidantes constataram diminuição da ativação de p-p38, p-JNK e p-ERK demonstrando que o extrato inibiu a fosforilação dessas proteínas aumentando a viabilidade celular (Tian et al., 2014). O astragalosídeo IV (AGS-IV) principal composto presente na planta *Astragalus membranaceus*, foi capaz de inibir em células PC12 o aumento dos níveis de MAPKs Raf, MEK e ERK fosforilados induzido pelo glutamato ao bloquear a fosforilação de dessas proteínas. Este efeito indica que a via das MAPK é um regulador importante da apoptose neuronal (Yue et al., 2015).

Nossos resultados corroboram com esses achados ao demonstrar que na presença do EDAC e da cumarina isolada as células PC12 tiveram diminuição da fosforilação de ERK a partir do dano induzido por glutamato. Além da inibição da fosforilação, também observamos diminuição de ERK1/2 total, indicando que os compostos podem também estar agindo na inibição da expressão da proteína.

A condição de isquemia contribui para o aumento do estresse oxidativo no tecido (Kalogeris et al., 2012). Este estresse surge a partir da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição do potencial de mecanismos antioxidantes endógenos, não conseguindo conter o dano (Orellana-Urzúa et al., 2023). O potencial antioxidante de compostos naturais vem sendo estudado com o objetivo de usá-los para

neutralizar as lesões causadas pela ROS (Abudurexiti et al., 2023). Em estudo, neurônios do hipocampo pré-tratados com estigmasterol (20 μ M) e submetidos a hipóxia por 3 horas e reperfusão por 96 horas foram capazes de diminuir a produção de ROS avaliada com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) na concentração de 10 μ M (Haque et al., 2021). Tal efeito, também foi observado nesta pesquisa em ensaio com DCFDA tanto para o EDAC quanto para a cumarina, confirmando o seu potencial como agente antioxidante.

Em cultura primária de astrócitos foi observada a capacidade de compostos de inibir o estresse oxidativo gerado pelo excesso de glutamato através do aumento da expressão da enzima glutamina sintetase (GS). Foi investigado os efeitos da histamina no dano às células astrocíticas avaliando a expressão de GS após de privação de oxigênio-glicose (OGD). Após 6 horas de OGD foi observada diminuição na expressão de GS e aumento do nível de glutamato extracelular. Na presença de histamina, um neurotransmissor, foi possível observar aumento da indução da expressão de GS e consequente proteção dos astrócitos (X. Wang et al., 2013).

Outro estudo expôs astrócitos de cultura primária ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratamento com o endocanabinóide 2-araquidonil glicerol (2-AG). Ao avaliarem a expressão de GS, ERK1/2 e p38. A exposição ao LPS por 12 horas diminuiu a expressão de GS, ativou ERK1/2 diminuindo a viabilidade celular. Após tratamento com 2-AG, observou-se que o endocanabinóide foi capaz de diminuir a fosforilação de p38 e ERK1/2 e aumentar a expressão de GS modulando a sobrevivência dos astrócitos (Wang et al., 2018).

Em nosso trabalho evidenciamos o aumento da expressão de GS nas células de astrócitos expostas a cumarina. O EDAC não demonstrou aumento tão acentuado embora tenha sido capaz de proteger os astrócitos aumentando sua viabilidade celular. Estes resultados demonstram, então, o potencial da cumarina para a proteção de astrócitos através da indução do aumento da expressão de GS.

2. Conclusão

O presente estudo elucidou o efeito do EDAC e da cumarina em modelo de privação de oxigênio e glicose (OGD), e sugere a cumarina como o principal agente do extrato responsável por este efeito. Em modelo de toxicidade glutamatérgica, foi demonstrado o efeito do EDAC na diminuição da toxicidade gerada pelo glutamato e sugerido como mecanismos de ação neuroprotetora a diminuição da ativação de proteínas como ERK1/2 e consequente redução da ativação de caspase 3, inibindo indução de apoptose. Também foi demonstrado o potencial antioxidante do EDAC e da cumarina isolada na redução de ROS. Tomados em conjunto, nosso estudo fornece evidências de que o EDAC e a cumarina são agentes neuroprotetores que previnem o dano gerado pela OGD e pela excitotoxicidade, e incentiva sua aplicação em estudos pré-clínicos que busquem o desenvolvimento de novos medicamentos para minimizar as sequelas de pacientes que sofreram AVE isquêmico.

3. Referências

- Abudurexiti, A., Feng, B., Nong, Q., Zhang, Y., Xu, Z., He, C., Huang, H., Chen, J., & Gao, H. (2023). Review Article Protective effects of Chinese herbal monomers against ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Translational Research*, *15*(5), 3026–3039.
- Bano, D., & Nicotera, P. (2007). Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke*, *38*(2 PART 2), 674–676. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000256294.46009.29>
- Bellaver, B., Souza, D. G., Bobermin, L. D., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Quincozes-Santos, A. (2015). Resveratrol Protects Hippocampal Astrocytes Against LPS-Induced Neurotoxicity Through HO-1, p38 and ERK Pathways. *Neurochemical Research*, *40*(8), 1600–1608. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1636-8>
- Butt, A. M., Vanzulli, I., Papanikolaou, M., De La Rocha, I. C., & Hawkins, V. E. (2017). Metabotropic Glutamate Receptors Protect Oligodendrocytes from Acute Ischemia in the Mouse Optic Nerve. *Neurochemical Research*, *42*(9), 2468–2478. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2220-1>
- Cai, L., Wang, H., Li, Q., Qian, Y., & Yao, W. (2008). Salidroside inhibits H₂O₂-induced apoptosis in PC 12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *40*(9), 796–802. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00463.x>
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). 2. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, *296*(5573), 1655–1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Chang, R., Zhou, R., Qi, X., Wang, J., Wu, F., Yang, W., Zhang, W., Sun, T., Li, Y., & Yu, J. (2016). Protective effects of aloin on oxygen and glucose deprivation-induced injury in PC12 cells. In *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.01.001>
- Chen, H., Cao, J., Zhu, Z., Zhang, G., Shan, L., & Yu, P. (2018). A Novel Tetramethylpyrazine Derivative Protects Against Glutamate-Induced Cytotoxicity Through PGC1 α / Nrf2 and PI3K / Akt Signaling Pathways. *12*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00567>
- Christensen, M. C., Valiente, R., Sampaio Silva, G., Lee, W. C., Dutcher, S., Guimarães Rocha, M. S., & Massaro, A. (2009). Acute treatment costs of stroke in Brazil. *Neuroepidemiology*, *32*(2), 142–149. <https://doi.org/10.1159/000184747>
- Conditions, O. C. (2020). Vessels , Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, *9*.
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., Veeresh, P., Kotian, V., Kalia, K., Borah, A., Wang, X., Dave, K. R., Yavagal, D. R., & Bhattacharya, P. (2020). Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*, *11*(6), 1185–1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>
- De Araújo, A. B., Azul, F. V. C. S., Silva, F. R. M., De Almeida, T. S., Oliveira, J. V. N., Pimenta, A. T. Á., Bezerra, A. M. E., Machado, N. J., & Leal, L. K. A. M. (2022). 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*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/6304087>
- Feigin, V. L., Stark, B. A., Johnson, C. O., Roth, G. A., Bisignano, C., Abady, G. G., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abedi, V., Abualhasan, A., Abu-Rmeileh, N. M. E., Abushouk, A. I., Adebayo, O. M., Agarwal, G., Agasthi, P., Ahinkorah, B. O., Ahmad, S., Ahmadi, S., ... Murray, C. J. L. (2021). Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*, *20*(10), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00252-0)

- Ferreira, R. S., Ribeiro, P. R., Silva, J. H. C. e., Hoppe, J. B., de Almeida, M. M. A., de Lima Ferreira, B. C., Andrade, G. B., de Souza, S. B., Ferdandez, L. G., de Fátima Dias Costa, M., Salbego, C. G., Rivera, A. D., Longoni, A., de Assis, A. M., Pieropan, F., Moreira, J. C. F., Costa, S. L., Butt, A. M., & da Silva, V. D. A. (2023). Amburana cearensis seed extract stimulates astrocyte glutamate homeostatic mechanisms in hippocampal brain slices and protects oligodendrocytes against ischemia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03959-0>
- Fylaktakidou, K., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., & Nicolaidis, D. (2005). Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 10(30), 3813–3833. <https://doi.org/10.2174/1381612043382710>
- Greenberg, D. A., & Jin, K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature*, 438(7070), 954–959. <https://doi.org/10.1038/nature04481>
- Haque, M. N., Hannan, M. A., Dash, R., Choi, S. M., & Moon, I. S. (2021). The potential LXR β agonist stigmaterol protects against hypoxia/reoxygenation injury by modulating mitophagy in primary hippocampal neurons. *Phytomedicine*, 81(February 2020), 153415. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153415>
- Iadecola, C., Anrather, J., & Medical, W. C. (2012). *N-terminal a Dystroglycan (aaDG-N): A Potential Serum Biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy*. 17(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>.The
- Jiang, H., Zhang, L., Koubi, D., Kuo, J., Groc, L., Rodriguez, A. I., Hunter, T. J., Tang, S., Lazarovici, P., Gautam, S. C., & Levine, R. A. (2005). Roles of Ras-Erk in apoptosis of PC12 cells induced by trophic factor withdrawal or oxidative stress. *Journal of Molecular Neuroscience*, 25(2), 133–140. <https://doi.org/10.1385/JMN:25:2:133>
- Jin, Y., Fan, J. T., Gu, X. L., Zhang, L. Y., Han, J., Du, S. H., & Zhang, A. X. (2017). Neuroprotective Activity of Cerebrosides from Typhonium giganteum by Regulating Caspase-3 and Bax/Bcl-2 Signaling Pathways in PC12 Cells. *Journal of Natural Products*, 80(6), 1734–1741. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00954>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 298). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kong, T., Liu, M., Ji, B., Bai, B., Cheng, B., & Wang, C. (2019). Role of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway in Ischemia-Reperfusion Injury. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01038>
- Kuriakose, D., & Xiao, Z. (2020). Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 20, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
- Lahiani, A., Brand-Yavin, A., Yavin, E., & Lazarovici, P. (2018). Neuroprotective effects of bioactive compounds and mapk pathway modulation in “ischemia”—stressed PC12 pheochromocytoma cells. *Brain Sciences*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/brainsci8020032>
- Lee, R. H. C., Lee, M. H. H., Wu, C. Y. C., Couto E Silva, A., Possoit, H. E., Hsieh, T. H., Minagar, A., & Lin, H. W. (2018). Cerebral ischemia and neuroregeneration. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 13, Issue 3, pp. 373–385). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.228711>
- Li, Z., Xiao, G., Wang, H., He, S., & Zhu, Y. (2021). A preparation of Ginkgo biloba L. leaves extract inhibits the apoptosis of hippocampal neurons in post-stroke mice via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and Caspase-3. *Journal of Ethnopharmacology*, 280(10), 114481. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114481>
- Lima Pereira, É.P., Santos Souza, C., Amparo, J., Short Ferreira, R., Nuñez-Figueroa, Y., Gonzaga Fernandez, L., Ribeiro, P. R., Braga-de-Souza, S., Amaral da Silva, V. D., & Lima Costa, S. (2017). Amburana cearensis seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, 209.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.017>

- Lima Pereira, Érica Patrícia, Santos Souza, C., Amparo, J., Short Ferreira, R., Nuñez-Figueredo, Y., Gonzaga Fernandez, L., Ribeiro, P. R., Braga-de-Souza, S., Amaral da Silva, V. D., & Lima Costa, S. (2017). Amburana cearensis seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, 209, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.017>
- Liu, X., Zhu, X., Chen, M., Ge, Q., Shen, Y., & Pan, S. (2016). Resveratrol protects PC12 cells against OGD / R-induced apoptosis via the mitochondrial- mediated signaling pathway. 1–12. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw011>
- Lowry, H., & Randall, R. J. (n.d.). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Mehta, S. L., Manhas, N., & Raghur, R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. In *Brain Research Reviews* (Vol. 54, Issue 1, pp. 34–66). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.11.003>
- Mohimani, H., Gurevich², A., Mikheenko², A., Garg³, N., Nothias³, L.-F., Ninomiya⁴, A., Takada⁴, K., Dorrestein, P. C., & Pevzner¹, P. A. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102227>. Palmitic
- Neurologi, P. A. K. (2019). 1. *Stroke*.
- Orellana-Urzúa, S., Briones-Valdivieso, C., Chichiarelli, S., Saso, L., & Rodrigo, R. (2023). Potential Role of Natural Antioxidants in Countering Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Stroke. *Antioxidants*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/antiox12091760>
- Pereira, E. P. L., Braga-de-Souza, S., Santos, C. C., Santos, L. O., Cerqueira, M. D., Ribeiro, P. R., Fernandez, L. G., Silva, V. D. A., & Costa, S. L. (2017). Amburana cearensis seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(2), 199–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.010>
- Posada-Duque, R. A., Barreto, G. E., & Cardona-Gomez, G. P. (2014). Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00231>
- Rai, S. N., Dilmashin, H., Birla, H., Singh, S. Sen, Zahra, W., Rathore, A. S., Singh, B. K., & Singh, S. P. (2019). The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity Research*, 35(3), 775–795. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-0003-y>
- Sadeghnia, H. R., Kolangikhah, M., Asadpour, E., Forouzanfar, F., & Hosseinzadeh, H. (2017). Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5), 594–603. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.8847>
- Safanelli, J., Vieira, L. G. D. R., Araujo, T. De, Manchope, L. F. S., Kuhlhoff, M. H. R., Nagel, V., Conforto, A. B., Silva, G. S., Mazin, S., Magalhães, P. S. C. De, & Cabral, N. L. (2019). The cost of stroke in a public hospital in Brazil: A one-year prospective study. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 77(6), 404–411. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20190059>
- Sánchez-Martínez, J. D., Alvarez-Rivera, G., Gallego, R., Fagundes, M. B., Valdés, A., Mendiola, J. A., Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2022). Neuroprotective potential of terpenoid-rich extracts from orange juice by-products obtained by pressurized liquid extraction. *Food Chemistry: X*, 13(February). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100242>
- Sánchez-Temprano, A., Relova, J. L., Camiña, J. P., & Pazos, Y. (2022). Concurrent Akt, ERK1/2 and AMPK Activation by Obestatin Inhibits Apoptotic Signaling Cascades on Nutrient-Deprived PC12 Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(5), 1607–1614. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01025-8>
- Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current Neuropharmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180302115544>

- Silva, J. H. C. e. , Rafael Short Ferreira, E. P. P., Suzana Braga-de-Souza I, M. M. A. de A. , Cleonice Creusa dos Santos, A. M. B. , Elisabetta Caiazzo, R. C., & Costa, V. D. A. da S. and S. L. (2020). Amburana cearensis: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds Juliana. *Molecules*, *25*, 1–16.
- Sweatt, S.K, Gower, B.A, Chieh, A.Y, Liu, Y, Li, L. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0504-4>. Pericytes
- Szydłowska, K., & Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, *47*(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.003>
- Tabakman, R., Lazarovici, P., & Kohen, R. (2002). Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, *68*(4), 463–469. <https://doi.org/10.1002/jnr.10228>
- Tapuwa, D., Musuka, M., Wilton, S., & Traboulsi, M. (2015). Diagnosis and Management of Acute Ischemic Stroke: Speed is Critical. *Cmaj*, *187*(12), 887–893. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243819/>
- Teng, L., Meng, Q., Lu, J., Xie, J., Wang, Z., Liu, Y. A. N., & Wang, D. I. (2014). *Liquiritin modulates ERK - and AKT / GSK - 3 β - dependent pathways to protect against glutamate - induced cell damage in differentiated PC12 cells.* 818–824. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2289>
- Tian, X., Sui, S., Huang, J., Bai, J. P., Ren, T. S., & Zhao, Q. C. (2014). Neuroprotective effects of Arctium lappa L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *38*(1), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.017>
- van der Burgh, R., & Boes, M. (2015). Mitochondria in autoinflammation: Cause, mediator or bystander? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *26*(5), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.004>
- Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, *2013*(Table 1). <https://doi.org/10.1155/2013/963248>
- Wang, S., Zhang, H., Geng, B., Xie, Q., Li, W., Deng, Y., Shi, W., Pan, Y., Kang, X., & Wang, J. (2018). 2-arachidonyl glycerol modulates astrocytic glutamine synthetase via p38 and ERK1/2 pathways. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1254-x>
- Wang, X., Hu, W., Yan, H., Tan, L., Gao, J., Tian, Y., Shi, X., Hou, W., Li, J., Shen, Y., & Chen, Z. (2013). Neuroscience Letters Modulation of astrocytic glutamine synthetase expression and cell viability by histamine in cultured cortical astrocytes exposed to OGD insults. *Neuroscience Letters*, *549*, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.013>
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., ... Forsythe, I. (2009). HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl_1), D603–D610. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn810>
- Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., & Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, *6*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-11>
- Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P. Y., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y., & Li, C. J. (2018). Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *46*(4), 1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(10), 2656–2664. <https://doi.org/10.1172/JCI26373>
- Yapca, O. E., Borekci, B., & Suleyman, H. (2013). Ischemia-reperfusion damage. *Eurasian Journal of Medicine*, *45*(2), 126–127. <https://doi.org/10.5152/eajm.2013.24>

- Yue, R., Li, X., Chen, B., Zhao, J., He, W., Yuan, H., Yuan, X., Gao, N., Wu, G., Jin, H., Shan, L., & Zhang, W. (2015). Astragaloside IV attenuates glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells through Raf-MEK-ERK pathway. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126603>
- Zhang, M., Liu, Q., Meng, H., Duan, H., Liu, X., Wu, J., Gao, F., Wang, S., Tan, R., & Yuan, J. (2024). Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01688-x>
- Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., & Du, G. (2018). PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular Medicine Reports*, *18*(4), 3547–3554.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>

4. Apêndice

10.1 Glutamato (20 mM) é tóxico para cultura primária de astrócitos

O efeito citotóxico induzido pelo glutamato nas concentrações de 5mM, 10mM, e 20mM sob a viabilidade das células foi determinado a partir do teste de MTT 24h após o tratamento em condições comparativas ao controle (meio puro com soro fetal bovino) (Figura 15). Os resultados demonstraram que o glutamato apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas, tendo (90% ± 4) para 5mM e (88% ± 4) para 10mM. Na concentração de 20mM foi observada uma maior redução de viabilidade quando comparado ao controle, tendo apenas (75% ± 7) de viabilidade celular. Por isso, foi selecionada a concentração de 20mM para os ensaios de neuroproteção com o EDAC e a cumarina.

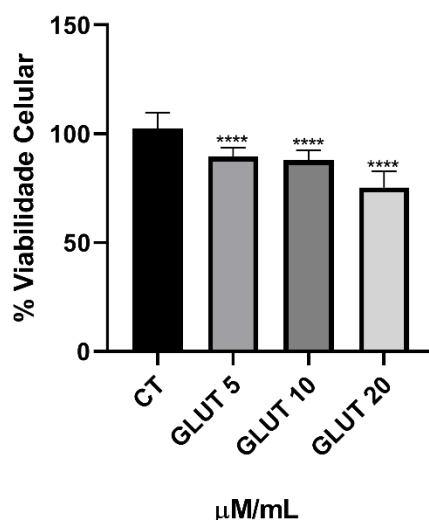


Figura 16. Efeitos do glutamato na viabilidade celular de cultura primária de astrócitos. Os astrócitos foram incubados por 24h em meio contendo diferentes concentrações de glutamato (5-20mM). ****p<0,0001 representa diferença estatística com o controle. n=3.

10.2 EDAC e cumarina não são tóxicos para cultura primária de astrócitos

A curva de toxicidade para definir as concentrações de trabalho do EDAC e da cumarina foram feitas através da técnica de MTT após 24h de tratamento (Figura 16). Foram testadas as concentrações de 5, 50 e 500μg/ml para o EDAC e para a cumarina. O controle recebeu apenas DMSO equivalente a maior concentração testada, totalizando em 0,05%. Os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações testadas foram tóxicas para a cultura primária de astrócitos, tanto para EDAC quanto para cumarina.

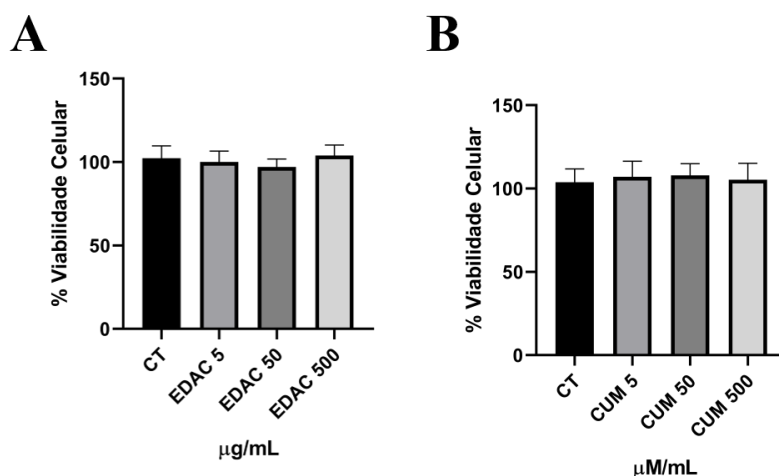


Figura 17. Efeitos do EDAC e da cumarina na viabilidade celular em cultura primária de astrócitos. Os astrócitos foram incubados por 24h em meio com soro contendo diferentes concentrações de EDAC e cumarina (5-500µg). A) Curva de toxicidade do EDAC. B) Curva de toxicidade da cumarina. ****p<0,0001 representa diferença estatística com o controle. n=3.

10.3 EDAC e da cumarina não protegem contra dano induzido por glutamato em cultura primária de astrócitos

Após 24h de tratamento concomitante do glutamato 20mM com EDAC e glutamato 20mM e cumarina (5-500µg) foi avaliada a viabilidade celular por teste de MTT (Figura 17). Observou-se que o glutamato foi capaz de diminuir a viabilidade celular para (75% ± 7) quando comparada ao controle. Nas culturas tratadas com glutamato + EDAC a viabilidade celular aumentou para (82% ± 9) na concentração de 5 µg/ml, para (82% ± 11) com 50µg/ml e para (85% ± 9) com 500 µg/ml. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Para o glutamato + cumarina a viabilidade celular aumentou para (97% ± 4) na concentração de 5 µg/ml, para (95% ± 6) com 50µg/ml e para (95% ± 2) com 500 µg/ml, porém, não apresentaram diferença estatística. Esses achados demonstram que EDAC e cumarina não foram capazes de proteger os astrócitos contra o dano gerado pelo glutamato.

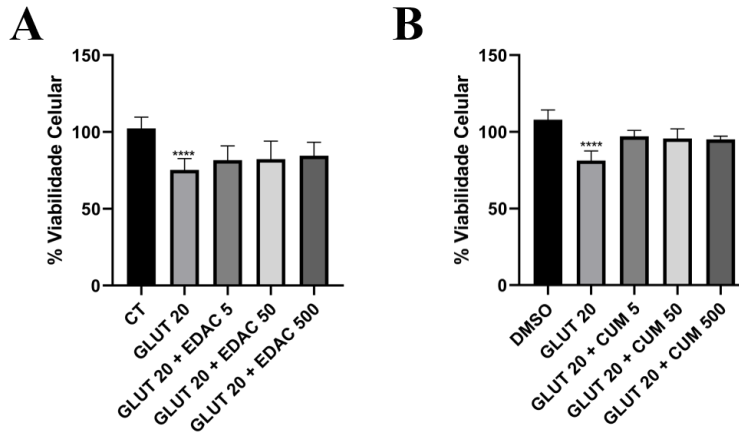


Figura 18. Efeitos do tratamento concomitante (glutamato + EDAC) e (glutamato + cumarina) na viabilidade celular de astrócitos de cultura primária. A) Curva de neuroproteção do EDAC. B) Curva de neuroproteção da cumarina. n=3.

10.4 EDAC e cumarina aumentam a expressão de Glutamina Sintetase (GS) em cultura primária de astrócitos a partir do dano gerado por glutamato

A análise de expressão proteica por Western Blotting demonstrou que o glutamato (20 mM) aumentou a expressão de GS (503.9 % \pm 0.0) em células PC12 após 24 horas de tratamento quando comparado com a condição de controle (100% \pm 0.0) (Figura 18). Em tratamento concomitante de glutamato e cumarina observa-se aumento da expressão de GS em (680 % \pm 0.0) para cumarina. Já para o EDAC a expressão de GS (427 % \pm 0.0) não foi aumentada quando comparada com o dano, mas cresceu significativamente quando comparada ao controle.

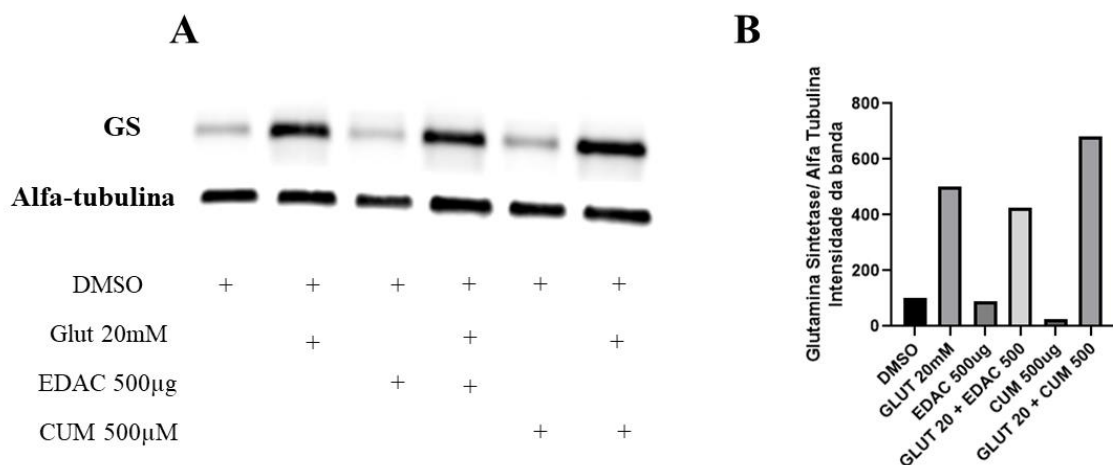


Figura 19. Western Blotting para detecção de glutamina sintetase (GS). A) Expressão das bandas de GS e Alfa-tubulina (controle de depósito). B) Média de fluorescência das bandas de GS. N=1.