

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BERBERINA EM UM MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL  
GLOBAL *IN VITRO***

Elisa Nicoloso Simões Pires

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BERBERINA EM UM MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL  
GLOBAL *IN VITRO***

Elisa Nicoloso Simões Pires

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Nicoloso Simões Pires, Elisa  
EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BERBERINA EM UM MODELO  
DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL IN VITRO / Elisa  
Nicoloso Simões Pires. -- 2013.  
83 f.

Orientadora: Christianne Gazzana Salbego.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Neuroproteção. 2. Isquemia cerebral. 3. Cultura  
organotípica. 4. Sinalização celular. 5.  
Neuroinflamação. I. Gazzana Salbego, Christianne,  
orient. II. Título.

## **Dedicatória**

*Dedico a todos que contribuíram de diversas formas para a realização deste trabalho.*

*Principalmente a meus pais, Ibagé e Berenice, por todo apoio e incentivo na vida e pelas circunstâncias vividas por nós que me fizeram escolher pela pesquisa em saúde profissionalmente.*

## **Agradecimentos**

À Christianne Salbego, que me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho. Ensinou-me e orientou com confiança, liberdade e estímulo.

À prof<sup>a</sup>. Cristiane Matté, pela colaboração neste trabalho, atenção e disponibilidade nos experimentos e em conversas diversas.

Ao Rudimar Frozza, colega que me ensinou com total calma e competência a colocar este projeto em andamento. E, ainda, Juliana Hoppe, que deu continuidade nesta ajuda com vários momentos de descontração “extra-laboratório”.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório 23: Dani e Gaby(zinha), várias conversas, risadas e ideias profissionais e pessoais; À Bruna, minha primeira bolsista, sempre disposta a ajudar e aprender; À Mari, André, Leon, Aline e Pati, por todos os outros momentos bons dentro e fora do laboratório, como nossas reuniões “leves e saudáveis” na minha casa; e à Aline Longoni, membro honorário da outra “metade” do 23, pelas conversas, amizade e apoios diversos nestes dois anos.

A todos os outros amigos do departamento de Bioquímica, distribuídos pelos diversos laboratórios, pelas conversas de corredor duradouras.

Aos profissionais do Biotério, em especial à Patrícia; e da sala de Apoio da cultura, fundamentais para a execução dos experimentos.

Aos coordenadores, professores e funcionários do PPG Bioquímica, pela excelência e incentivo à formação de pesquisadores competentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e à CAPES pela oportunidade e pela bolsa concedida durante o mestrado.

À UFRGS, pelo ótimo ensinamento durante a graduação em Biomedicina e durante o mestrado.

Em especial aos meus pais, meus exemplos de vida. Pai, agradeço a confiança, apoio e dedicação dobrada nestes últimos 11 anos. Mãe, agradeço o colo e incentivo dado mesmo “aí em cima”. Tu foste um dos motivos que me fizeram seguir pela pesquisa, só desviei um pouco do propósito inicial...

Aos meus irmãos Tomás e Livia, pelos momentos familiares e de descontração. Ainda, por me tornarem tia coruja durante este trabalho.

E ainda ao Oscar, pela paciência de tentar entender com que trabalho, pelo companheirismo, carinho e amor.

## Índice

APRESENTAÇÃO.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A isquemia cerebral.....	1
1.2. Principais características da morte celular na isquemia.....	2
1.3. A cultura organotípica.....	3
1.4. Ativação glial e Neuroinflamação.....	4
1.4.1. A microglia.....	5
1.4.2. Os astrócitos.....	6
1.4.3. O estresse oxidativo.....	7
1.5. Berberina.....	8
1.5.1. Aspectos gerais.....	8
1.5.2. Alvos moleculares.....	10
2. OBJETIVO.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. CAPÍTULO 1.....	13
4. CAPÍTULO 2.....	38
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Artigos Científicos a serem submetidos, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** mostra o embasamento teórico que nos levou a formular a proposta de trabalho. Os materiais, métodos e resultados, assim como as referências bibliográficas específicas, encontram-se no corpo de cada trabalho, os quais estão apresentados na forma de **artigos científicos**, denominados Capítulos 1 e 2. Esses trabalhos foram realizados no Laboratório de Neuroproteção e Sinalização Celular do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em colaboração com o laboratório coordenado pela professora Dr<sup>a</sup>. Cristiane Matté, da mesma Instituição.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais obtidas na dissertação.

A seção **Perspectivas** discute as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos, dando continuidade a essa linha de pesquisa.

A seção **Referências Bibliográficas** lista as referências utilizadas na Introdução e Discussão da dissertação.



## RESUMO

Dentre as doenças cerebrovasculares, a isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de mortalidade em países industrializados. Dados do Ministério da Saúde (2008) apontam que aproximadamente 10% da mortalidade no Brasil foram devido a essas doenças. Como ainda não há um tratamento efetivo para a recuperação tecidual e/ou funcional do cérebro após a IC, isto leva à procura de novas terapias que consigam interromper a cascata bioquímica que leva à morte celular. A berberina é um alcalóide isolado de plantas medicinais de origem asiáticas. Esta droga vem sendo amplamente utilizada pela medicina popular chinesa e indiana. Devido a sua grande facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica, ela se tornou uma alternativa para estudos em doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Alguns relatos na literatura vêm demonstrando o potencial neuroprotetor da berberina em modelos *in vivo* e *in vitro* de isquemia cerebral global e/ou focal. No entanto, as bases moleculares para esta proteção não estão bem esclarecidas. Neste trabalho, avaliamos alguns mecanismos que são modulados pela berberina em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral global com utilização de cultura organotípica de hipocampo de ratos. Nossos resultados demonstraram uma menor morte celular na região do Corno de Ammon (CA) das fatias submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG) e tratadas com berberina durante 1 h. A análise das possíveis vias de sinalização envolvidas na neuroproteção mostrou que o efeito da berberina está associado à modulação da via de sobrevivência PI3K/Akt e um de seus substratos a GSK-3 $\beta$ . Além desses, também foi visto que a ação da berberina diminuiu a fosforilação da proteína de sinalização Jun cinase (JNK) e a atividade da enzima caspase-3, indutora de apoptose. Tendo em vista que a berberina agiu sobre a ativação da JNK, investigamos o efeito desta droga em outros marcadores de inflamação. Foi observada diminuição de astrócitos e microglia ativados assim como a secreção de citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos meios de cultivo das fatias submetidas à POG e tratadas com berberina. Em paralelo, a berberina reduziu a geração de espécies reativas do oxigênio (EROS), as quais são aumentadas rapidamente após um insulto isquêmico. Em conjunto, nossos resultados abrem uma perspectiva para a caracterização de uma nova droga neuroprotetora visando sua utilização como uma alternativa terapêutica contra os danos causados pela isquemia cerebral global.

## ABSTRACT

Cerebral ischemia is one of the leading causes of death in industrialized countries. Data from the Ministry of Health (Brazil) shows about 10% of Brazil's mortality was due this kind of injury. There is no still effective treatment for tissue and/or functional recovery, what leads to search for new therapies that could block the cell death biochemical pathway. Berberine is an alkaloid isolated from medical herbs with Asian origin. This drug has been widely used by popular Chinese and Indian medicine. Berberine can cross the blood brain barrier, which makes an alternative for neurodegeneratives and neuropsychiatry disorders. Studies have shown the neuroprotection effect of berberine on *in vivo* and *in vitro* global and/or focal cerebral ischemia models. However, the molecular basis for this protection is still unclear. In this work, we evaluated mechanisms modulated by Berberine in global cerebral ischemia model *in vitro* on rat organotypic hippocampal culture. Our results demonstrated a lower cell death on Cornis Ammonis (CA) region of the slices under oxygen and glucose deprivation (OGD) treated with berberine for 1 hour. The analysis of the involvement of cellular signaling pathway with the neuroprotective effect observed, showed that berberine affect the PI3K/Akt pathway and one of its substrates the GSK-3 $\beta$  protein. Also, berberine was able to decrease the phosphorylation of protein JNK and the caspase-3 activity, an apoptosis inducer. Once berberine modulated JNK, we investigated its effect on other inflammation markers. It was observed a decrease of astrocytes and microglia activation and cytokines (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) secretion on OGD-berberine treated culture medium. In the same way, berberine was able to reduce the reactive oxygen species (ROS) formation, which is a feature observed after an ischemic insult. Taken together, our findings open a perspective for the characterization of a new neuroprotective drug for future use as an alternative therapeutic strategy against damage caused by global cerebral ischemia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF: fator de indução de apoptose (**A**ppoptose **I**nduction **F**actor)

ACM: artéria cerebral média

AVC: acidente vascular cerebral

AVE: acidente vascular encefálico

Bcl-2: célula-B linfoma 2 (**B** cell **l**ymphoma **2**)

BER: berberina

BHE: barreira hematoencefálica

CA 1: corno de Ammon 1 (**C**ornus **A**mmonis)

CCL: quimiocina ligante do ligante (**c**hemokine (**C**-**C** motif) **l**igand )

COX-2: ciclooxigenase 2

CNS: sistema nervoso central (**C**entral **N**ervous **S**ystem)

DCF-DA - Dihidrodiclorofluoresceína diacetato

DG: giro denteado (**D**entate **G**yrus)

EROS: espécie reativa do oxigênio

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (**G**lial **F**ibrillary **A**cid **P**rotein)

GSK-3 $\beta$ : glicogênio sintase cinase 3 beta (**G**lycogen **S**ynthase **K**inase)

HBSS: solução salina balanceada de Hanks (**H**anks **B**alanced **S**alt **S**olution)

IL-6: interleucina 6

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta

iNOS: óxido nítrico sintase induzível (inducible **N**itric **O**xide **S**ynthase)

MEM: meio essencial mínimo (**M**inimal **E**ssential **M**edium)

NF $\kappa$ B: fator nuclear kappa B (**N**uclear **F**actor **k**appa **B**)

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

OGD: oxygen glucose deprivation

PI: iodeto de propídio (**P**ropidium iodide)

PI3K: fosfatidil-Inositol-3-cinase (**P**hosphoinositide-3-**K**inase)

POG: privação de oxigênio e glicose

ROS: espécies reativas de oxigênio (**R**eactive **O**xygen **S**pecies)

SOD: superóxido dismutase

SNC: sistema nervoso central

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa (**T**umor **N**ecrosis **F**actor alpha)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Isquemia Cerebral

Dentre as doenças cerebrovasculares, mais comumente chamadas de acidentes vasculares encefálicos (AVE's), a isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Calcula-se que em 2008 17,3 milhões de pessoas morreram por esta decorrência, o que representa 30% de todas as mortes registradas no mundo. Dentre estes números, 6,2 milhões foram em consequência de isquemia cerebral (WHO, 2012). Só no Brasil, a doença representa a primeira causa de morte e incapacidade, gerando grande impacto econômico e social. De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2009 foram registrados 68,9 mil óbitos por AVC. A doença está intimamente ligada a uma variedade de fatores de risco como hipertensão, hipercolesterolemia e diabete entre outros.

A bioenergética cerebral possui características próprias como uma taxa metabólica alta e, conseqüentemente, grande dependência do metabolismo aeróbico da glicose. Com isso, o encéfalo é altamente dependente do fluxo sanguíneo contínuo para seu completo funcionamento. Uma vez que neurônios não armazenam glicose, eles necessitam do sistema cardiovascular e dos astrócitos para fornecerem esta fonte de energia. Se o fluxo sanguíneo for drasticamente diminuído ou, então, cessado, resultará em um metabolismo aeróbico inadequado, alterações bioquímicas e moleculares que irão afetar a função celular negativamente (Lipton, 1999).

O tipo mais frequente de isquemia cerebral em humanos é a isquemia focal, definida como a interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro, afetando apenas as regiões circundantes à área não irrigada. Em geral utiliza-se a oclusão da artéria cerebral média (ACM) como modelo experimental. O segundo tipo é a isquemia

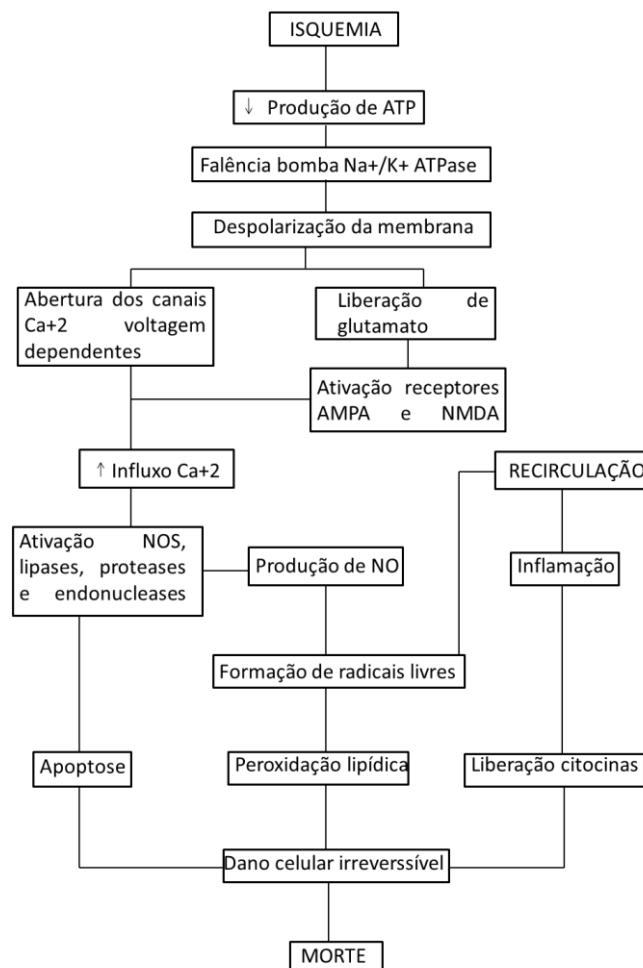
global, que resulta da interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, o que ocorre durante uma parada cardíaca, por exemplo. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sanguínea pode aumentar a morte neuronal, especificamente nas áreas mais vulneráveis do cérebro, como a região CA1 do hipocampo (Schmidt-Kastner e Freund, 1991).

Conforme citado anteriormente, a alta incidência deste tipo de lesão justifica o estudo de novas estratégias terapêuticas para reversão desse quadro, em especial visando a proteção das células das áreas afetadas. Apesar do aumento de estudos focados nos mecanismos celulares disparados pelo evento isquêmico, poucas alternativas terapêuticas são utilizadas na prática clínica. Atualmente, o tratamento aprovado e disponível é a trombólise. Porém, com inúmeras restrições, apenas 5% dos pacientes são aprovados para este tipo de tratamento (Hall et al, 2009).

## **1.2. Principais Características da Morte Celular na Isquemia**

A severidade do insulto isquêmico e a vulnerabilidade dos neurônios determinam o destino de morte ou sobrevivência destas células. A severidade depende da duração e intensidade da redução do fluxo sanguíneo cerebral que determina o grau de privação de oxigênio e glicose das células (Lipton, 1999). Além disso, a morte celular isquêmica é caracterizada por uma morte “tardia” entre o insulto e a manifestação de dano celular. Assim, quanto maior for a intensidade da privação do fluxo sanguíneo, menor é o tempo para o dano se desenvolver e iniciar a rota de morte isquêmica (Sugawara et al., 2004; Mehta et al., 2007).

Decorrente da falha energética ocorre despolarização neuronal, excessiva liberação e falha na recaptação do neurotransmissor glutamato, aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , produção excessiva de espécies reativas do oxigênio (EROS), depleção dos níveis de enzimas antioxidantes, produção de mediadores inflamatórios, além da ativação de segundos-mensageiros envolvidos na sinalização da morte celular programada. Essa sequência de eventos resulta em mudanças críticas funcionais e estruturais que levam à morte celular (Dirnagl et al., 1999; White et al., 2000).



**Figura 1.** Cascata neurotóxica/excitotoxicidade na isquemia e na recirculação. Adaptada de Araujo et al. (2008).

### 1.3. Cultura Organotípica

As técnicas *in vitro* são ferramentas importantes para o estudo de diversas doenças neurodegenerativas, uma vez que constituem um modelo mais simples e controlado para os estudos moleculares e celulares. As culturas organotípicas tornaram-se uma importante alternativa para a investigação da morte neuronal induzida por excitotoxinas (Abdel-Hamid e Tymianski, 1997), privação de oxigênio e glicose (Valentim et al., 2003; Horn et al., 2005), toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (Nassif et al., 2007; Frozza et al., 2009), dentre outras aplicações. Além disso, essas culturas vêm sendo utilizadas em nosso grupo para o estudo de compostos com possível atividade neuroprotetora frente a lesões (Cimarosti et al., 2005; Zamin et al., 2006).

Esse modelo de culturas foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler e modificado por Stoppini e colaboradores em 1991. Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo, sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo assim permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização do tecido como ela ocorre *in vivo*. Isso significa que todos os tipos celulares estão presentes e organizados da mesma forma que estariam *in vivo*, sendo essa uma grande vantagem dessa cultura sobre a cultura primária de tipos celulares específicos (Stoppini et al., 1991; Gähwiler et al., 1997).

Para a simulação de uma “isquemia *in vitro*” a cultura organotípica de hipocampo pode ser submetida a um modelo experimental que simula as condições de isquemia cerebral *in vivo*, o qual chamamos de privação de oxigênio e glicose (POG). Esse método consiste em expor as culturas a um meio sem glicose e a uma atmosfera saturada de nitrogênio. Essas condições simulam a falta de fluxo sanguíneo durante a



isquemia, sendo uma ótima alternativa para o estudo da isquemia cerebral e para uma triagem de potenciais agentes terapêuticos (Sundstrom et al., 2005), uma vez que essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (Strasser e Fischer, 1995; Noraberg et al., 1999; Noraberg et al., 2005).

#### **1.4. Ativação glial e neuroinflamação**

A inflamação vem sendo descrita como adjuvante para patogênese de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer (McGeer e McGeer, 2002; Salminen et al., 2009), doença de Parkinson (Tansey et al., 2007; Pradhan e Andreasson, 2013) e esclerose múltipla (Rossi et al., 2012). Ainda, vários estudos já demonstraram a participação dela nos efeitos deletérios após uma isquemia cerebral (Becker, 2001; Lambertsen et al., 2012; Simão et al., 2012). Drogas com propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e imunomoduladoras já vem sendo utilizadas na clínica com relativo sucesso para doenças como esclerose múltipla e adeno leucodistrofias (Zipp e Aktas, 2006).

No entanto, alguns autores (Hayen et al., 2000; Taoufik et al., 2008; Watters e O'Connor, 2011) também mostraram benefícios neuroprotetores a partir de citocinas e quimiocinas secretadas em decorrência da inflamação. Os efeitos que as moléculas inflamatórias terão sobre o tecido nervoso dependerão da intensidade do estímulo, das suas características e dos diferentes níveis e estados de ativação dos receptores dessas moléculas em cada um dos tipos celulares afetados (Sriram e O'Callaghan, 2007).

A permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica (BHE) restringe a resposta imunológica dentro do encéfalo, condição que o levou a ser descrito como “órgão imunologicamente privilegiado”. No entanto, isso é uma afirmação parcial uma vez que em determinadas situações pode-se observar a infiltração de células, principalmente linfócitos (Engelhardt e Ransohoff, 2005). Na maioria dos casos, porém, apenas a microglia e os astrócitos são ativados, sendo esses dois tipos celulares, em especial o primeiro, os responsáveis pela resposta imunológica no sistema nervoso central (SNC) (Liberto et al., 2004; Rock et al., 2004; Sriram e O’Callaghan, 2007).

#### 1.4.1. A microglia

As células microgliais são de origem mesodérmica e são consideradas os macrófagos que residem no SNC. Estão localizadas no parênquima tecidual, em todas as regiões do SNC e adquirem um fenótipo ramificado específico no estado não ativado ou a forma ameboide, quando ativadas por algum estímulo. A microglia no cérebro adulto é considerada quiescente, devido à baixa expressão de moléculas ativadoras destas células e sua forma “ativada” é caracterizada por uma troca de atividades e não por uma “ativação” *per se* (Kettenmman et al., 2011).

Em resposta ao dano tecidual, elas migram para a região do dano e mudam sua forma. Passam, então, a secretar uma gama de fatores relacionados com a resposta imunológica, o que as conferem um papel importante na defesa do SNC (Rock et al., 2004). Essas células podem ser reconhecidas no tecido pela marcação com anticorpos específicos como anti-CD11b (OX42) (Strassburger et al., 2008) ou por sua reatividade com a lectina isolada de *Griffonia simplicifolia* Isolectina IB4, também conhecida como GSA, que marca resíduos de galactose presentes apenas na

membrana dessas células a qual é amplamente utilizada na literatura para identificação da microglia (Buffo et al., 2008; Benakis et al., 2010).

Dentre as substâncias secretadas pela microglia podemos citar o glutamato, fatores de crescimento como NGF e TGF $\beta$ , citocinas como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e TNF $\alpha$ , espécies reativas como óxido nítrico e ânions superóxido (Koutsilieri et al., 2002), além de quimiocinas, mediadores lipídicos, fatores de coagulação e componentes de matriz extracelular. Além disso, na forma ativada aumentam a produção de COX-2, participando ativamente na síntese de prostanóides como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, importantes mediadores da resposta inflamatória (Rock et al., 2004; Sriram e O' Callaghan, 2007). O potencial protetor *versus* destrutivo dessas células é ditado pelo tipo de estímulo, sua intensidade e sua duração. Os fatores secretados podem ser tóxicos ou protetores dependendo da sua concentração e da disponibilidade de receptores para ligarem.

#### 1.4.2. Os astrócitos

De origem neural, os astrócitos são as células da glia mais numerosas e de funções variadas; como a manutenção da homeostase no SNC, a participação na estrutura da BHE, o metabolismo de neurotransmissores, a produção de fatores tróficos e o suporte energético para os neurônios (He e Sun, 2007; Seth e Koul, 2008). Sua morfologia celular com núcleo esférico central e diversos prolongamentos expressam numerosos receptores. Isso os capacita a responder a praticamente todos os compostos neuroativos, como neurotransmissores, neuropeptídeos, fatores de crescimento, citocinas e toxinas (Liberto et al., 2004).

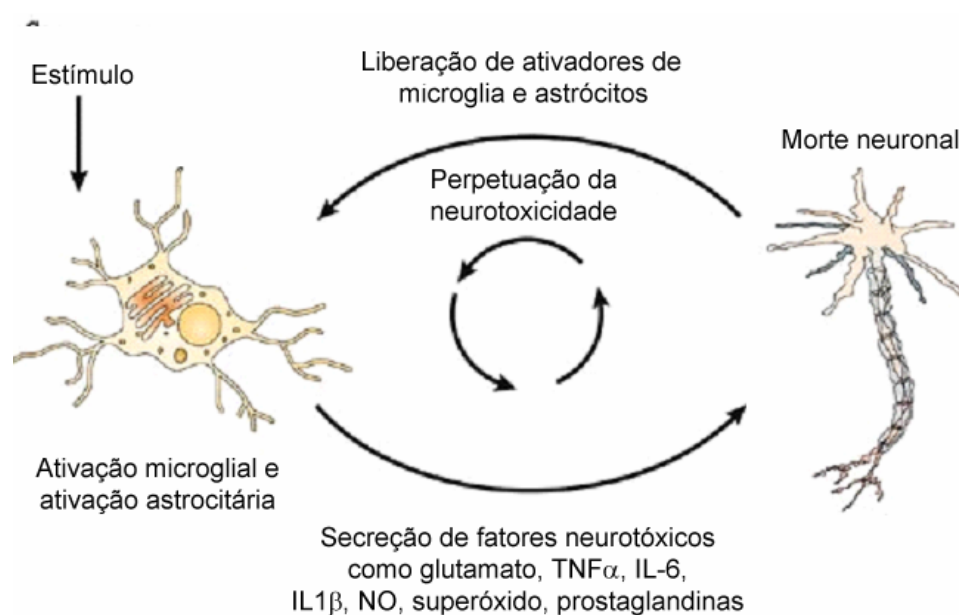
Após um insulto ou outras patologias, como uma isquemia, ocorre um fenômeno chamado astrogliose reativa. Esse processo é caracterizado por hipertrofia, proliferação celular, extensão dos processos celulares, aumento na produção das proteínas GFAP, vimentina e nestina e secreção de citocinas (Liberto et al., 2004; Buffo et al., 2008). Em consequência da gliose reativa, há a formação da cicatriz glial, que acredita-se ser responsável pela inibição do crescimento dos neuritos, dificultando a regeneração no SNC após lesões. Além disso, essa cicatriz inibe a comunicação entre os processos neuronais já existentes (Silver e Miller, 2004).

Além disso, a gliose reativa faz com que os astrócitos passem a secretar várias citocinas quando ativados em resposta a estímulos, dentre elas TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de passar a produzir e liberar prostanóides e óxido nítrico, o que pode ativar a microglia e agravar o dano causado por uma lesão (Liberto et al., 2004). Cabe salientar que, apesar da microglia produzir quantidades maiores dessas moléculas que os astrócitos, a contribuição deles no agravamento das lesões não pode ser considerada desprezível.

#### *1.4.3. O estresse oxidativo*

É definido como um desequilíbrio entre os processos bioquímicos que levam à geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN) e os processos responsáveis pela sua remoção. O SNC é particularmente sensível ao insulto oxidativo, uma vez que utiliza grandes quantidades de O<sub>2</sub>, possui concentrações baixas de antioxidantes e enzimas relacionadas, possui um grande conteúdo de lipídios poliinsaturados e um alto conteúdo de metais de transição, muito importantes na catálise das reações geradoras de espécies reativas (Chan, 2001).

O estresse oxidativo, assim como a inflamação, pode possuir um papel benéfico ou deletério, dependendo da sua intensidade (Valko et al., 2007). Ele está descrito como participando em várias doenças neurodegenerativas e como sendo crucial na neurotoxicidade e morte celular nessas patologias (Valko et al., 2007; Sayre et al., 2008). Como já citado anteriormente, tanto a microglia quanto os astrócitos são importantes fontes de espécies reativas como NO e superóxido, participando ativamente no dano oxidativo (Simão et al., 2011). Além disso, citocinas como  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  aumentam a produção de ROS na mitocôndria das células, alimentando o sistema positivamente (Sugawara et al., 2004).



**Figura 1:** Participação da ativação glial na morte neuronal. Adaptada de Block et al. (2007).

## 1.5. Berberina

### 1.5.1. Aspectos gerais

A berberina (Ber) é um alcalóide de gosto amargo e utilizado como corante e é conhecido como “amarelo natural 18”. Este componente é isolado de plantas medicinais como *Berberis* sp., *Coptidis* sp. e *Phellodendris* sp. de origem asiática. *Berberis aristata*, a maior fonte de Ber, é um arbusto de altura entre 1,5–2,0 metros e nativa do Himalaia e sul da Índia (Kulkarni e Dhir, 2010).

Tem sua primeira perspectiva terapêutica relatada em 1911 e, desde então, tem sido amplamente utilizada no tratamento de diarreia bacteriana, infecções parasitárias intestinais e tracoma ocular pela medicina chinesa e indiana (Kulkarni e Dhir, 2010). Geralmente, é administrado na forma de cloridrato ou sulfato para aplicações clínicas. Porém, o uso da Ber é limitado devido a sua baixa biodisponibilidade oral. Há estudos que mostram a contribuição da glicoproteína-P para a baixa absorção intestinal da Ber e a utilização de inibidores desta glicoproteína poderia aumentar a disponibilidade no organismo (Pan et al., 2002).

Após administração intravenosa (3 mg/kg., i.v.) em ratos, a Ber mostrou uma complexa correlação farmacocinético-farmacodinâmica. No plasma, Ber foi rapidamente eliminada com uma meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de 1,13 h. No entanto, no hipocampo houve um aumento rápido ( $t_{1/2} = 0,215$  h), pico em 3,67 h e uma taxa de eliminação lenta ( $t_{1/2} = 12$  h), na qual sugere que Ber pode ter uma ação direta em neurônios e se acumular no hipocampo (Wang et al., 2005a).

Também já foi confirmado que Ber passa pela mesma biotransformação em humanos (300 mg., v.o. três vezes ao dia por dois dias) e ratos (100 mg/kg., v.o) (Qiu

*et al.*, 2008). Portanto, estes roedores podem ser empregados como modelo animal para avaliação das atividades terapêuticas da berberina.

Além de suas ações antimicrobiana e antiparasitária, esse alcalóide também parece possuir atividades antiglicêmicas (Gulfranz *et al.*, 2008) e antitumorais (Chen *et al.*, 2009). Devido à facilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, a berberina se tornou uma alternativa para o estudo de sua ação em doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Kulkarni e Dhir, 2010).

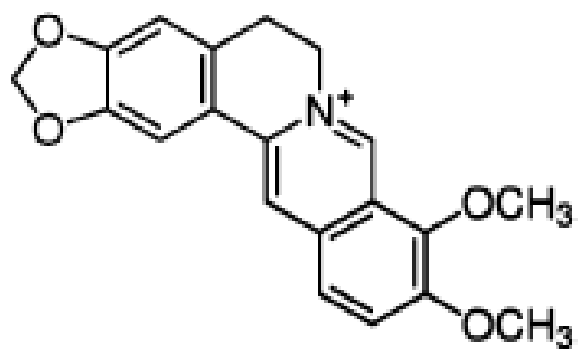
### 1.5.2. Alvos moleculares

Tem sido demonstrado o potencial neuroprotetor da berberina em modelos animais submetidos à lesão que mimetizam a isquemia cerebral global e/ou focal. Dentre eles foi visto, em modelo *in vitro* em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, que sua ação, pelo menos em parte, é mediada pela supressão da fosforilação/inibição da proteína Bcl-2 (proteína da membrana mitocondrial interna de célula-B linfoma 2), que bloqueia a apoptose (Cui *et al.*, 2009).

Também foi demonstrado que a berberina diminuiu a resposta neurológica após a lesão isquêmica e reduziu a região infartada em modelo *in vivo* de isquemia cerebral em camundongos. Ainda, foi descrito que a berberina inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação de fatores pró-apoptóticos e, dessa maneira, exercendo efeito protetor sobre células PC12 (Zhou *et al.*, 2008).

Já um estudo utilizando o extrato alcoólico de *Berberis koreana*, mostrou seu efeito anti-inflamatório por meio da inibição da expressão de COX-2 (enzima-chave na conversão de ácido araquidônico à prostaglandina e tromboxano, induzida em resposta a estímulos inflamatórios) e, conseqüente, diminuição da produção de PGE2 (produto primário do metabolismo do ácido araquidônico) em modelos animais *in vitro*

e *in vivo* de isquemia cerebral (Yoo et al., 2008). Porém, ainda há pouca informação na literatura sobre o mecanismo de ação envolvido com o efeito da berberina após uma isquemia cerebral global ou focal.



**Figura 2.** Estrutura e fontes de berberina. Adaptada de Kulkarni e Dhir (2010).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar um possível efeito neuroprotetor, e o mecanismo envolvido, da berberina em modelo *in vitro* de privação de glicose e oxigênio, mimetizando a isquemia cerebral.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Ativação da via de sinalização de sobrevivência PI3K/Akt e, conseqüente, aumento de GSK-3 $\beta$  fosforilada.

2. Diminuição da proteína JNK ativada e da atividade da caspase-3, ocasionando o bloqueio de morte por apoptose.

3. Modulação de parâmetros associados à inflamação, focando na ativação de astrócitos e microglia, liberação de citocinas e produção de espécies reativas do oxigênio.

## **CAPÍTULO 1**

### **BERBERINE WAS NEUROPROTECTIVE AGAINST AN *IN VITRO* MODEL BRAIN ISCHEMIA: SURVIVAL AND APOPTOSIS PATHWAYS INVOLVED**

Elisa Nicoloso Simões Pires, Rudimar Luiz Frozza, Juliana Bender Hoppe, Bruna de  
Melo Menezes and Christianne Gazzana Salbego

**Periódico:** Neurochemistry International

**Status:** a ser submetido

**BERBERINE WAS NEUROPROTECTIVE AGAINST AN *IN VITRO* MODEL BRAIN ISCHEMIA:  
SURVIVAL AND APOPTOSIS PATHWAYS INVOLVED**

Elisa Nicoloso Simões Pires<sup>1</sup>, Rudimar Luiz Frozza<sup>1</sup>, Juliana Bender Hoppe<sup>1</sup>, Bruna de Melo Menezes<sup>2</sup> and Christianne Gazzana Salbego<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding Author:

Christianne Salbego (salbego@terra.com.br)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo I, Laboratório 37, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: +55 (51) 3308.5548 ; FAX: +55 (51) 3308.5535

## Abstract

Berberine is an alkaloid derived from herb *Berberis* sp. and has long use on Oriental medicine. Studies among the years have demonstrated its beneficial effect in various neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. The subject of this study was to evaluate whether Berberine protects against delayed neuronal cell death on organotypic hippocampal culture (OHC) exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) and the cell signaling mechanism related to its effect. Hippocampal slices were obtained from 6-8-days-old male Wistar rat and cultured for 14 days. Following, the cultures were exposed to 1 hour of OGD and then treated with Berberine (10 and 20  $\mu$ M). After 24 h recovery, propidium iodide (PI) uptake was analyzed and it was observed a decrease on PI uptake on OGD Ber-treated culture, which means a decrease on cellular death. Western blot analysis showed that proteins Akt , GSK3 $\beta$  and JNK appear to play a role on berberine-mediated neuroprotection. Furthermore, caspase-3 activity of OGD Ber-treated culture was diminished by control level on a fluorimetry assay. These findings suggest that berberine-mediated neuroprotection after ischemia involves Akt/GSK3 $\beta$  survival/apoptotic signaling pathway as well as JNK and caspase-3 activity inhibition

*Keywords:* Oxygen and glucose deprivation; berberine; neuroprotection; Akt/GSK3 $\beta$ ; JNK; caspase-3

## 1. Introduction

Cerebral ischemia is one of the leading causes of death worldwide. The injured neurons undergo through biochemical cascade that leads to cell death. Despite increasing studies focused on mechanisms of ischemia have been reported, the only effective treatment is thrombolysis. However, due to its numerous limitations restrict, only about 5% of the patients can be selected for this treatment (Hall et al., 2009).

Berberine (Ber) is a major alkaloid isolated from medicinal herbs such as *Berberis* sp., *Coptidis* sp. and *Phellodendri* sp. and has a long history on Chinese and Indian medicine (Kulkarni and Dhir, 2010). Studies demonstrated its multiple pharmacological actions, including anti-inflammatory effects (Wu et al., 2012), diarrhea-treating action (Brisdall and Kelly, 1997) and glucose-lowering potential (Di Pierro et al., 2012). Furthermore, it was reported that berberine has potent neuroprotective effects against brain ischemia (Wang et al., 2004; Yoo et al., 2006), Alzheimer's disease (Zhu and Qian, 2006; Ji and Shen, 2011) and brain tumor (Eom et al., 2008).

There appear to be at least two major modes of cell death involved on ischemic neuron death, apoptosis and necrosis (Lipton, 1999). Increasing evidence shows that apoptosis is caused by an unbalance in signaling events, including Phosphatidylinositide 3-kinases pathway (PI3K). The serine–threonine kinase, Akt (also known protein kinase B), is a downstream kinase of PI3K and becomes activated by phosphorylation of residues Thr-308 and Ser-473. This kinase can be phosphorylated by PDK1 and PDK2 or by PI3K directly and plays an important role for death/survival processes (Horn et al., 2005). Akt mediates its anti-apoptotic effects by phosphorylating, among others, GSK3 $\beta$ , Bad, NF $\kappa$ B and CREB (Mehta et al., 2007). Serine–threonine kinase glycogen synthase kinase 3- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) is particularly abundant in the central nervous system and is neuron-specific and is a key regulator in

several physiological processes, such as cell cycle and apoptosis in neuronal cells during hypoxia. GSK3 $\beta$  induce Caspase3 activation and activate the pro-apoptotic tumor suppressor gene, p53 (Loberg, 2002). Akt phosphorylation of GSK3 $\beta$  on Ser9 and its inactivation, may mediate some anti-apoptotic stimuli (Zhang et al., 2012). Stress-activated protein kinases (SAPK)/Jun amino-terminal kinases (JNK) are members of the Mitogen-activated protein kinases (MAPK) family and are activated by a variety of environmental stresses, inflammatory cytokines and growth factors. Those signals are delivered to this cascade by small GTPases of the Rho family (Rac, Rho, cdc42). SAPK/JNK translocate to the nucleus where it can regulate the activity of multiple transcription factors resulting on cell growth, differentiation, survival and apoptosis (Moulin and Widmann, 2004).

Despite global cerebral ischemia suppress the continuous blood flux during the outcome, the hippocampus is one of the most sensitive regions to the effects of the insult. Distinct subfields show differential vulnerability to cell death: the CA1 pyramidal neurons are vulnerable, whereas the granular cells of the dentate gyrus (DG) are resistant. This differential pattern of damage of CA1 cells versus preservation of DG cells creates an ideal model for comparing cell death vulnerability in areas within the same region of the brain (Lipton, 1999; Horn et al., 2005).

The aim of this study was to verify berberine neuroprotective effect on organotypic hippocampal culture exposed to oxygen and glucose deprivation, an *in vitro* model of cerebral global ischemia, focusing on PI3K/Akt pathway and its consequent signaling. For this purpose, cultures were treated with different concentrations of berberine, based on the literature, and then exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD). We analyzed the cell death/survival by propidium iodide (PI) uptake, phosphorylation of signaling proteins and caspase activation.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Organotypic Hippocampal Cultures

Organotypic hippocampal cultures were prepared according to the method of Stoppini et al., (1991) with some modifications (Valentim et al., 2003). The local Animal Care Committee approved all animal procedures used. Hippocampal slices were obtained from 6–8-day-old male Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400  $\mu\text{m}$ ), using a McIlwain tissue chopper. Slices were separated in a Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco) supplemented with 25 mM HEPES, 1% Fungizone and 36  $\mu\text{l}/100\text{ ml}$  gentamicin, pH 7.2. Six slices were placed on one Millicell culture insert (Millicell- CM, 0.4  $\mu\text{m}$ ) and the inserts were transferred to a six-well culture plate (Cell Culture Cluster, TPP) with 1 ml of culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM) (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with glucose 36 mM, glutamine 2 mM, HEPES 25 mM and  $\text{NaHCO}_3$  4 mM (final concentrations). Fungizone 1% and gentamicin 36  $\mu\text{l}/100\text{ ml}$  were added to the medium. The pH was adjusted to 7.3 and immediately after the solution was filtered (Millex-GS, Millipore). The plates were then placed in an incubator at 37°C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . The medium was changed twice a week and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

## 2.2. Oxygen and Glucose Deprivation (OGD)

The induction of OGD was based on the method described by Strasser and Fischer, 1995 with some modifications (Cimarosti et al., 2001). Cultures were carefully rinsed three times with OGD medium composed by: CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, KCl 5.36 mM, NaCl 136.9 mM, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.34 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.44 mM, HEPES 25 mM, pH 7.2. Slices were left in 1 ml of this medium for 15 min, and then the medium was exchanged by one with the same composition previously bubbled with nitrogen for 30 min. The cultures were transferred to an anaerobic chamber at 37°C in which the oxygen was replaced by nitrogen, and left in these conditions for 60 min. Slices were washed three times with HBSS and treated with 10 and 20 µM of berberine chloride (Sigma) diluted in water (37 °C) added to the culture medium. After, the plates returned to usual culture conditions for 24 h recovery time with culture medium berberine treated.

## 2.3. Quantification of Cellular Death

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Valentim et al., 2003; Horn et al., 2005). PI 5 µM was added 1 h before the end of the recovery period and cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter. Images were captured and analyzed using Scion Image software ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). The area where PI fluorescence was detectable above background levels was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of damage.



## 2.4. Western blot analysis

After obtaining fluorescent images, slices were homogenized on lyses buffer, aliquots were taken for protein determination and  $\beta$ -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Proteins were resolved (50  $\mu$ g per lane) on SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electro transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus. Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20, pH 7.4) and further incubated with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution overnight at 4°C. Primary antibodies anti-pAkt/Ser473 (1:1000), anti-Akt (1:1000), anti-pGSK3 $\beta$ /Ser9 (1:1000), anti-GSK3 $\beta$  (1:1000), anti-pJNK (1:1000) and anti-JNK/Thr183-Tyr185 (1:1000) were used. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies (1:1000) for 2 h. The chemiluminescence was detected using X-ray films that were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instruments). All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, USA. Data are expressed as percentage of control cultures.

## 2.5. Caspase Activity Measurement

Caspase 3 activity was measured by the cleavage of the fluorescent substrate Ac-DEVD-AFC (Sigma). The procedure with OHC, OGD and treatment (Ber 10  $\mu$ M) were the same described above. Twenty four hours after recovery, the slices were taken out from culture membranes and lysed on ice-cold solution of PBS and Triton x-100 0.2%. The extract was centrifuged at 10,000 x g for 5 min and the supernatant

were collected. For each experiment, 30 µg of protein was incubated with a reaction buffer containing (g/ml): Sucrose 0.1, CHAPS 0.001, BSA 0.0001 and HEPES-NaOH 0.024, pH 7.5 in a 96 wells black plate. The caspase 3 substrate was present at a final concentration of 20 µM. The plate was incubated at 37°C for 10 minutes under agitation. Samples were assayed using SoftMax Pro fluorescence plate reader (Molecular Devices®, USA). Data are expressed as percentage of control cultures.

## 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey's test (GraphPad Prism software 5.0). Differences between mean values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of berberine treatment in organotypic hippocampal cultures after OGD

Exposure of cultures to 10 – 20 µM of berberine caused a marked decrease in cell death, as shown by the intense fluorescence due to incorporation of PI in hippocampus after 24 h of recovery (Fig. 2A). The indicating protective effect of berberine against *in vitro* ischemia-induced hippocampal cell damage seemed to be

concentration-dependent manner. The concentration of 10  $\mu\text{M}$  was the chosen for the following analysis.

Quantification of PI fluorescence showed that the exposure of cultures to OGD caused around 30% of damage in hippocampus after 24 h of recovery, a significant increase when compared to control cultures (Fig. 2B). The damage induced by OGD was mainly observed in CA1, CA2 and CA3 areas. Additionally, a small damage was sometimes observed in the inner blade of the DG area, as observed in Fig. 2A. This data confirms our previous work using the same experimental model of ischemic cell death (Valentim et al., 2003). When cultures were exposed to berberine, 10  $\mu\text{M}$  and 20  $\mu\text{M}$ , around 15-10% of decrease in PI staining was observed, respectively, showing a statistically significant neuroprotective effect when compared to OGD culture (Fig. 2B).

### 3.2. Phosphorylation of Akt/GSK3 $\beta$ signaling pathway is involved with berberine neuroprotective effect

As well established, kinase protein Akt plays a critical role to promote neuronal survival after global brain ischemia. And, as a downstream target, GSK3 $\beta$  is also involved on this type of neuronal injury, as we previously reported (Mehta et al., 2007). Therefore, we hypothesized that Akt pathway may be important for Ber-mediated neuroprotective effect. To detect the role of these signaling proteins, we performed western blots (Figs. 3A and 3C). The expression of pAkt and pGSK3 $\beta$  from OGD culture was significantly decreased when compared to control culture (Fig. 3B, and Fig. 3D, respectively). As shown on Fig. 3B and 3D, OGD berberine-treated cultures indicate a significant increase on protein Akt and GSK3 $\beta$  phosphorylation when compared with OGD culture. Also, OGD berberine-treated cultures demonstrated a 2.0 fold increase on pAkt level when compared to control culture (Fig 3B).

### 3.3. Inhibition of JNK signaling pathway plays a role on berberine-mediated neuroprotective

Apoptosis is involved in the ischemic cell death pathway and can be mediated by several signaling molecules, such as pro-apoptotic proteins BAX and Bcl-Xs (Cui et al., 2009), caspase family (Ouyang et al., 1999; Horn et al., 2005) and cytokines liberation (Yassuda et al., 2011; Simão et al., 2012). JNK is a common upstream pathway protein that can lead to those apoptotic responses signaling, as study has been demonstrated (Wang et al., 2007). To confirm the role of JNK as a protein-related to ischemic death and if is involved with the berberine neuroprotective effect, we analyzed the phosphorylation content on cell culture.

As shown on Fig. 4A, the exposure to OGD induced an increase of 3.29 fold on JNK phosphorylation when compared to control culture. However when cultures were treated with berberine, the level of JNK phosphorylation was similar to control cultures (Fig. 4A and 4B).

### 3.4. Berberine neuroprotective effect decreases caspase 3 activity

There are further chemical changes that are suggestive of apoptosis and are expressed in vulnerable CA1 area. Induction of classical apoptosis by caspase 3 occurs on cells after global ischemia before and during the time of maximal cell death (Lipton, 1999). Based in that information we carried out a fluorimetry assay for the effector caspase 3. A higher caspase activity was detected on OGD culture (Fig. 5), whereas in cultures treated with berberine was observed a lower caspase 3 activity, which was similar to that observed in control cultures (Fig.5).

#### 4. Discussion

There are two major types of cerebral ischemia, focal and global. The brain injury caused by transient global cerebral ischemia is characterized by a delayed selective death of CA1 pyramidal neurons in the hippocampus (Kirino, 1982; Lipton, 1999). This region is critically involved in spatial learning and memory, and the degeneration of pyramidal neurons results in impairment of these functions (Bendel et al., 2005, Frozza et al., 2013). One of the principal features of OHC is to keep the tissue organization as *in vivo*: the slice presents all types and organized cells as in the *in vivo* form. This experimental model of brain ischemia has a great advantage over others cultures since they keep several global brain ischemia *in vivo* aspects, such as delayed neuronal death and selective vulnerability (Strasser e Fischer, 1995; Noraberg et al., 1999; Noraberg et al., 2005, Zamin et al., 2006).

The present study provides evidence that berberine addition to the culture medium of hippocampal organotypic culture, after OGD exposition, an *in vitro* model of brain ischemia, had neuroprotective effect as seen by a decrease in incorporation of dye propidium iodide, and this effect appears to be mediated via modulation of cellular signaling PI3K/Akt and JNK, leading to decreased activation of caspase 3, involved in mediation of apoptotic cell death.

Studies have demonstrated potential cell protective mechanism of berberine on cerebral ischemia such as: involvement of Akt, GSK3 $\beta$ , CREB on cerebral cortex on *in vivo* rat model of permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) (Zhang et al., 2012) and Bcl-2 (Cui et al., 2009), cytochrome C release (Zhou et al., 2008) on mouse OHC and PC12 cell OGD model, respectively. Akt is well known to be the primary basis of neuronal survival and prevent the progression of apoptotic stimuli after brain ischemia outcome. These finding is confirmed with the use of Akt inhibitor LY294002

on brain ischemic model (Horn et al., 2005). In the present work, our results suggest that the Akt phosphorylation is acting on berberine-mediated neuroprotective effect and contributes to hippocampal cell surviving and thus suppress apoptosis.

The targets of the protein Akt are many and varied, but all of them are related to cell proliferation and/or survival and result in antiapoptotic effect. These physiological roles of Akt include involvement in metabolism, protein synthesis, apoptosis pathways, transcription factor regulation and the cell cycle. Akt exerts its effects in the cell by phosphorylating a variety of downstream substrates, including GSK3 $\beta$ , Bcl-2 – family member Bad and CREB (Downward, 1998). Our data demonstrated an enhanced phosphorylation of GSK3 $\beta$  at Ser9 on OGD-treated culture, blocked the protein activation and consequently negatively regulates its pro-apoptotic signaling. A role for GSK3 $\beta$  in ischemia has been demonstrated is the use of a GSK3 $\beta$  inhibitor to decrease infarct size in rodents (Kelly et al., 2004). As our data suggest, Akt/ GSK3 $\beta$  pathway is likely to be important on Ber neuroprotection effect, given the abundance of GSK3 $\beta$  on central nervous system and its role on ischemia.

In this study, we defined the relationship between Ber and Akt/GSK signaling, as well as JNK in ischemic hippocampal tissue. Members of the JNK family play crucial roles in regulating responses to various Stresses, and in Neural Development, Inflammation, and Apoptosis (Simão et al., 2012). Besides Stress, JNKs can also be activated via GPCRs (G-Protein Coupled Receptors), RTKs (Receptor Tyrosine Kinases) and Cytokine Receptors. Growth Factors also activate JNKs. Although the Signaling cascade from Growth Factor Receptors to ERKs is relatively well understood, the pathway leading to JNK activation is more unclear (Mehta et al., 2007). Growth Factors and Growth Factor Receptors stimulate Ras and PI3K, an Akt upstream protein, also activate Ras (Downward, 1998). Our results demonstrated the JNK pathway was for instance shown to be involved on Ber-mediated neuroprotection on OGD culture. The causes of cell death in stroke are multifactorial and are influenced by

the ischemic environment lacking nutrients and oxygen, coupled with the loss of survival signals towards apoptosis and inflammation, for example. We have started to investigate cytokine secretion *in vitro* after OGD to combine with these data and have a more detailed of JNK activation by Ber treatment. Thereby combined results and use of inhibitors of the PI3K/Akt and MAPK pathways could affect more significantly the Ber-mediated neuroprotection.

Apoptosis is proved playing a role in neuronal death on human stroke and its animal models several hours after ischemia evidenced on studies. The activation of caspases, particularly caspase-3, and inhibition of cell death by inhibition of these proteases is the strongest criterion. Caspase do not appear to be activated in necrotic death (Lipton, 1999). The Caspase cascade is activated by two distinct routes: one from cell surface and the other from mitochondria. The pathway leading to Caspase activation varies according to the apoptotic stimulus. Another evidence for caspase involvement is the upregulation of the enzyme. This occurs either by cleaving the existing procaspases or by synthesizing a new enzyme that is then cleaved (Sugawara et al., 2004). In this study, we shown the significantly increase of caspase-3 activation on OGD culture. After Ber treatment, the protein activity was on same control level. Other studies goes on the same direction as ours: where caspase-3-like mRNA is upregulated between 8 and 24 h after 15- to 30-min ischemia in rat, predominantly in CA1 pyramidal cells, and total caspase-3 protein is increased by 8 h. And also, caspase-3-like activity measured on artificial substrate was elevated about 10-fold in hippocampus between 8 and 24 h after ischemia (Chen et al., 1998).

In conclusion, we demonstrated the phosphorylation of Akt/GSK3 $\beta$  pathway and the involvement of JNK and caspase-3 inhibition after Berberine treatment of Organotypic hippocampal culture following an *in vitro* global brain ischemia model. Our study provides beneficial evidences for early administration of Ber and its underling

mechanisms and interrelated pathways that may rescue neuronal cells after global brain ischemia.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPERGS, CNPq and CAPES.



## 5. References

Benakis C, Bonny C, Lorenz Hirt. 2009. JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia. *Brain, Behavior, and Immunity* 24: 800–811

Bendel, O, Bueters, T, von Euler, M, Ove Ogren, S, Sandin, J, von Euler, G (2005). Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25: 1586-95.

Birdsall TC, Kelly GS. 1997. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev* 2: 94–103.

Chen J, Nagayama T, Jin K. 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 18: 4914–4928.

Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, Rocha, E, Salbego C. 2001. An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 315:33–36.

Cui HS, Matsumoto K, Murakami Y, Hori H, Zhao Q, Obi R. 2009. Berberine Exerts Neuroprotective Actions against in Vitro Ischemia- Induced Neuronal Cell Damage in Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Involvement of B-Cell Lymphoma 2 Phosphorylation Suppression *Biol. Pharm. Bull.* 32:79-85.

Di Pierro F, Villanova N, Agostini F, Marzocchi R, Soverini V, Marchesini G. 2012. Pilot study on the additive effects of berberine and oral type 2 diabetes agents for patients with suboptimal glycemic control. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 5:213-7. doi: 10.2147/DMSO.S33718. Epub 2012 Jul 17.

Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:262–

267.

Eom KS, Hong JM, Youn MJ, So HS, Park R, Kim JM, Kim TY. 2008. Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway. *Biol Pharm Bull.* 31(4):558-62.

Frezza RL, Bernardi A, Hoppe JB, Meneghetti AB, Matté A, Battastini AMO, Pohlmann AR, Guterres SS, Salbego CG (2013). Neuroprotective Effects of Resveratrol Against A $\beta$  Administration in Rats are Improved by Lipid-Core Nanocapsules. *Mol Neurobiol* 47:1066–1080. doi 10.1007/s12035-013-8401-2

Hall AA, Leonardo CC, Collier LA, Rowe DD, Willing AE, Pennypacker, KR. 2009. Delayed Treatments for Stroke Influence Neuronal Death in Rat Organotypic Slice Cultures Subjected to Oxygen Glucose Deprivation. *Neuroscience.* 164(2): 470–477. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.051.

Horn AP, Gerhardt D, Geyer AG, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C. 2005. Cellular Death in Hippocampus in Response to PI3K Pathway Inhibition and Oxygen and Glucose Deprivation. *Neurochemical Research.* 30(3):355–361. DOI: 10.1007/s11064-005-2609-0

Ji HF, Shen L. 2011. Berberine: a potential multipotent natural product to combat Alzheimer's disease. *Molecules.* 16(8):6732-40. doi: 10.3390/molecules16086732.

Kelly S, Zhao H, Hua Sun G, Cheng D, Qiao Y, Luo J, Martin K, Steinberg GK, Harrison SD, Yenari MA. 2004. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 188(2):378-86.

Kirino, T (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239: 57-69.

Kulkarni SK, Dhir A. 2010. Berberine: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders *Phytother. Res.* 24:317–324.

Lipton P. 1999. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *physiol. rev.* 79(4):1431-1568.

Loberg RD, Vesely E, Brosius FC 3rd. 2002. Enhanced glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J Biol Chem.* 277(44): 41667-73.

Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics *Brain Res. Rev.* 54:34-66.

Moulin N, Widmann C. 2004. Islet-brain (IB)/JNK-interacting proteins (JIPs): future targets for the treatment of neurodegenerative diseases? *Curr Neurovasc Res.* 1(2):111-27.

Norberg J, Kristensen BW, Zimmer J (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Prot.* 3:278-290.

Norberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4:435-452.

Ouyang Y., Tan Y., Comb M., Liu C., Martone ME, Siesjo BK, Hu, B. 1999. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome c, and activation of caspase -like proteases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:1126–1135.

Simão F, Matté A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG. 2012. Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 5:659-65. doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.009. Epub 2012 Jun 16.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Meth.* 37:173-182.

Strasser U, Fischer G. 1995. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Meth.* 57:177-186.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *J Ame Soc Experiml NeuroTherap.* 1:17-25

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG. 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118:379-386.

Wang F, Zhao G, Cheng L, Zhou HY, Fu LY, Yao WX. 2004. Effects of berberine on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Brain Res.* 999: 91–97.

Wang Q, Zhang QG, Wu DN, Yin XH, Zhang GY. 2007. Neuroprotection of selenite against ischemic brain injury through negatively regulating early activation of ASK1/JNK cascade via activation of PI3K/AKT pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 28(1):19-27.

Wu YH, Chuang SY, Hong WC, Lai YJ, Chang GJ, Pang JH. 2012. Berberine reduces leukocyte adhesion to LPS-stimulated endothelial cells and VCAM-1 expression both *in vivo* and *in vitro*. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 25(3):741-50.

Yasuda Y, Shimoda T, Uno K, Tateishi N, Furuya S, Tsuchihashi Y, Kawai Y, Naruse S, Fujita S. 2011. Temporal and sequential changes of glial cells and cytokine

expression during neuronal degeneration after transient global ischemia in rats. *J Neuroinflammation*. 22(8)70. doi: 10.1186/1742-2094-8-70.

Yoo KY, Hwang IK, Lim BO, Kang TC, Kim DW, Kim SM, Lee HY, Kim JD, Won MH. 2006. Berberry extract reduces neuronal damage and N-Methyl-D-aspartate receptor 1 immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Biol Pharm Bull* 29: 623–628.

Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simão F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego C (2006). Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3K pathway. *Neurobiol Dis*. 24:170-182.

Zhou XQ, Zeng XN, Kong H, Zun XL 2008. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci. Letters*. 447:31–36.

Zhu F, Qian C. 2006. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 7: 78.

## Legends of figures

**Fig.1.** Berberine chemical structure.

**Fig.2.** Administration of Ber after OGD on OHC decrease PI uptake. (A) Representative pictures of OHC slices stained with propidium iodide after treatment with 10 and 20  $\mu\text{M}$  of Ber and after 24 h recovery (magnification: 40x). (B) PI incorporation quantification from pictures showed in (A). Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 12$ . #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone;  $p < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

**Fig.3.** Ber enhances Akt and GSK3 $\beta$  phosphorylation. Representative western blots showing levels of pAkt, Akt (A) and pGSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$  (C) in OHC culture. The average levels of pAkt (B) and pGSK3 $\beta$  (D) were increased on OGD Ber-treated culture after 24 h recovery. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 7/6$ , respectively. #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone;  $p < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

**Fig.4.** Ber decrease pJNK level on OGD-treated culture. (A) Representative western blots showing levels of pJNK and JNK in OHC culture. (B) The average level of pJNK was increased on OGD Ber-treated culture after 24 h recovery. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$ , respectively. #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone;  $p < 0.05$  (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

**Fig.5.** Lower caspase-3 activity following global ischemia after Ber treatment. Caspase-3 activity in OHC with Ber administration after OGD and 24 h recovery. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M., n =6, respectively. #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone; p < 0.05 (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Fig.1.

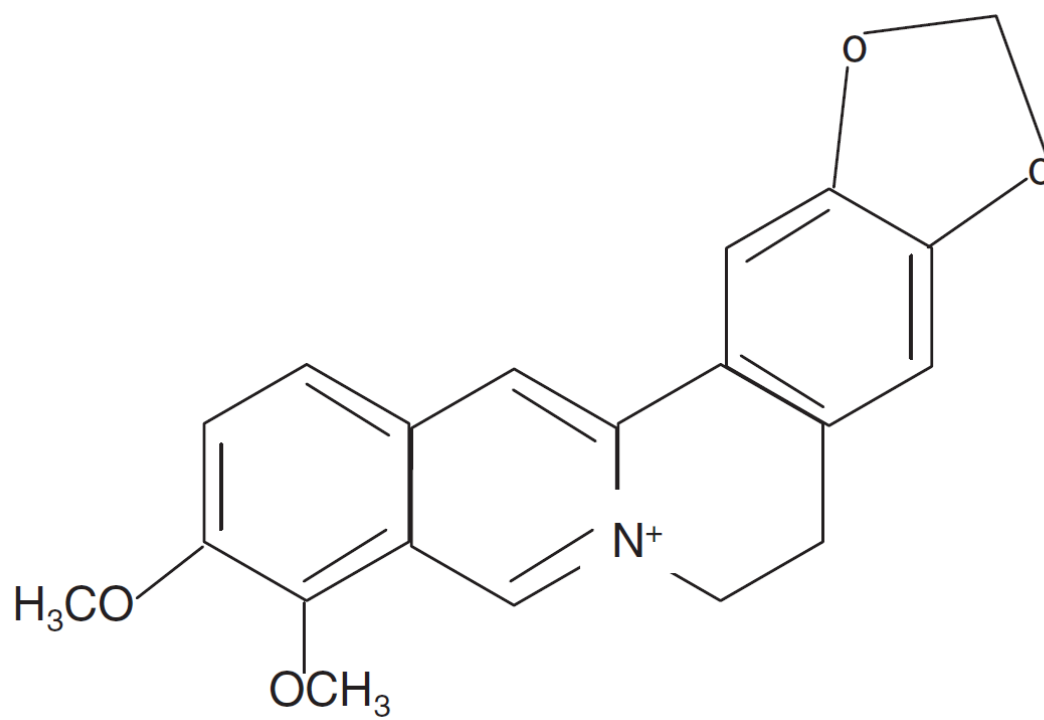




Fig.2.

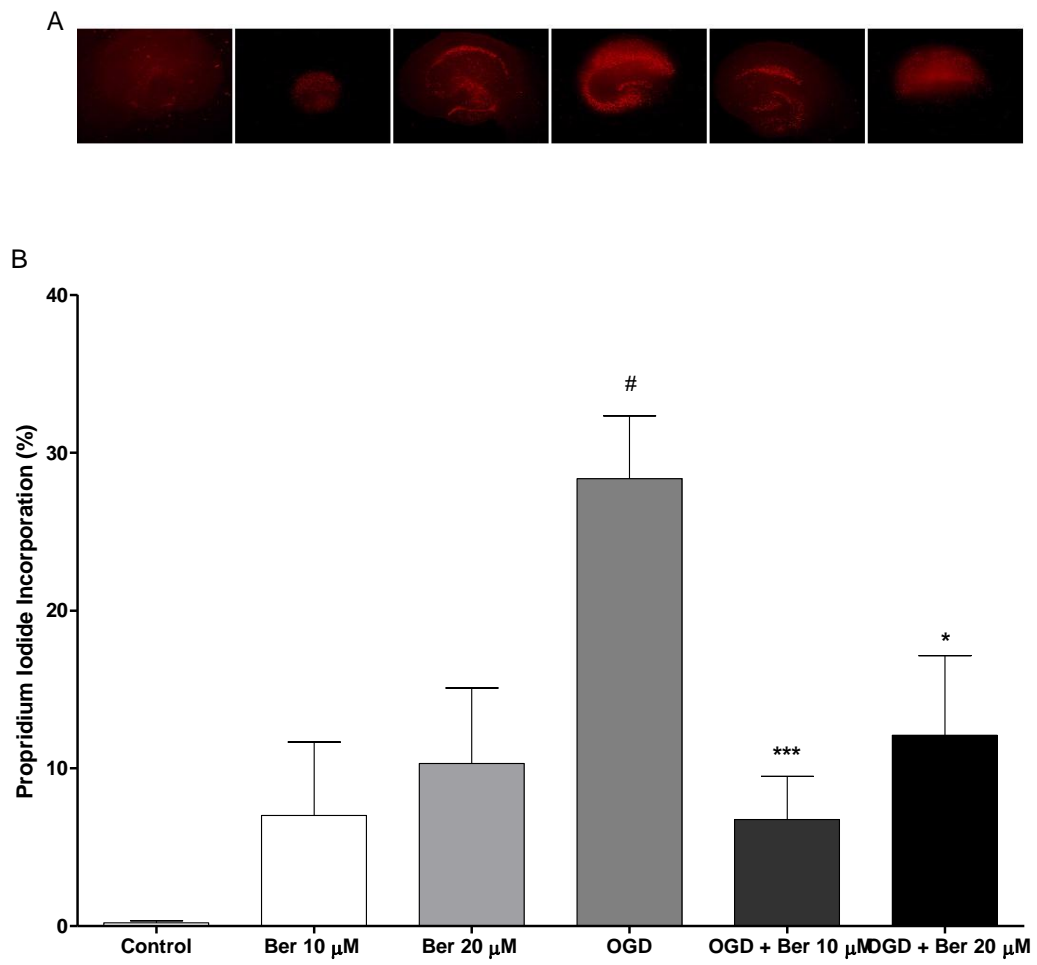


Fig.3.

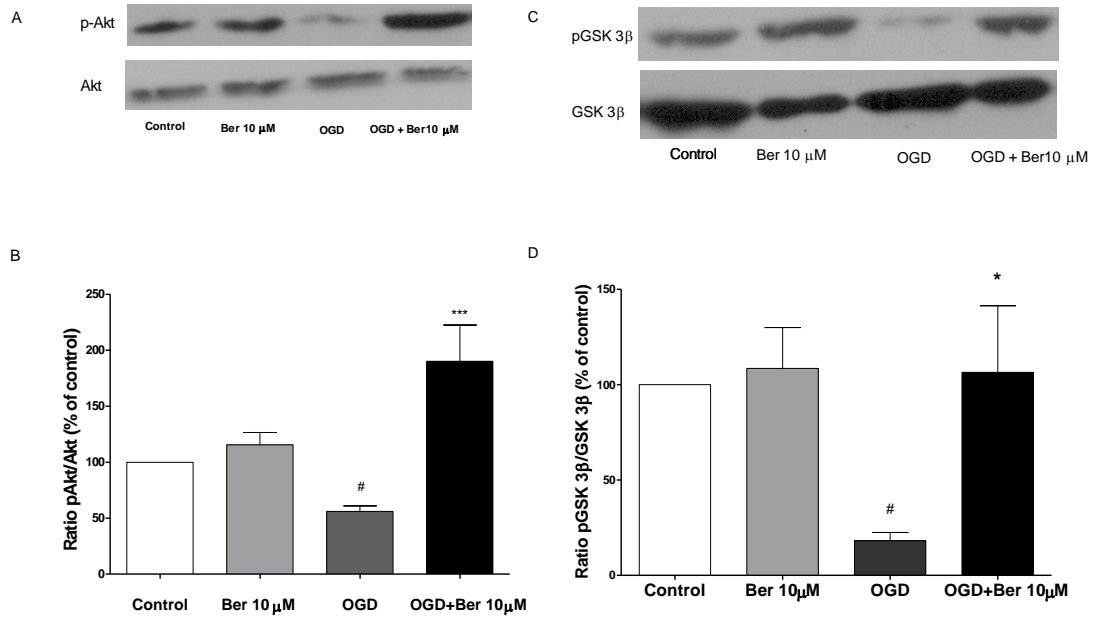
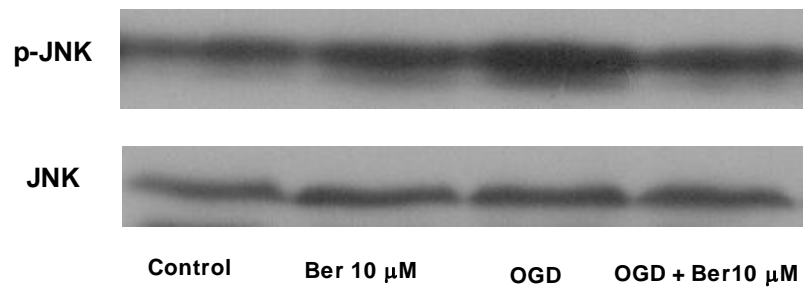


Fig.4.

A



B

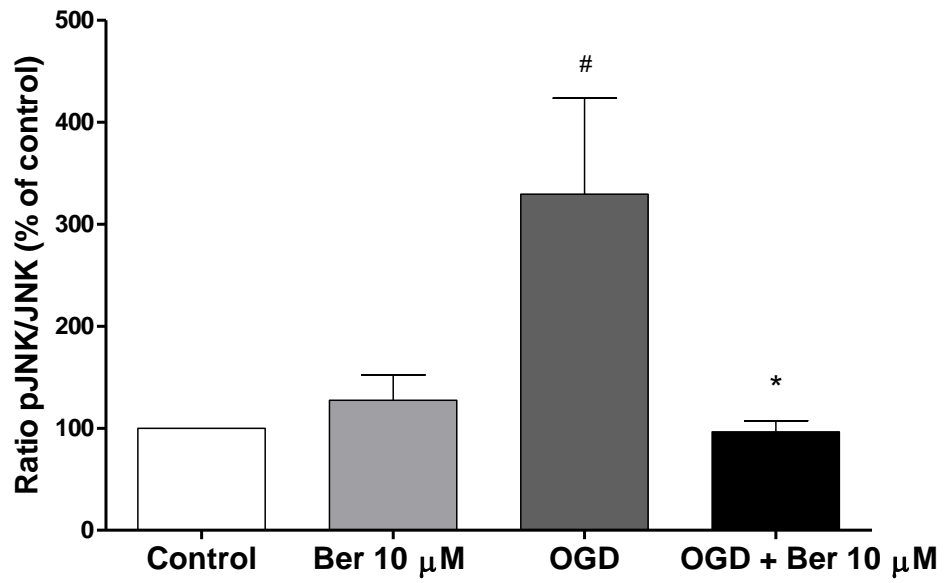
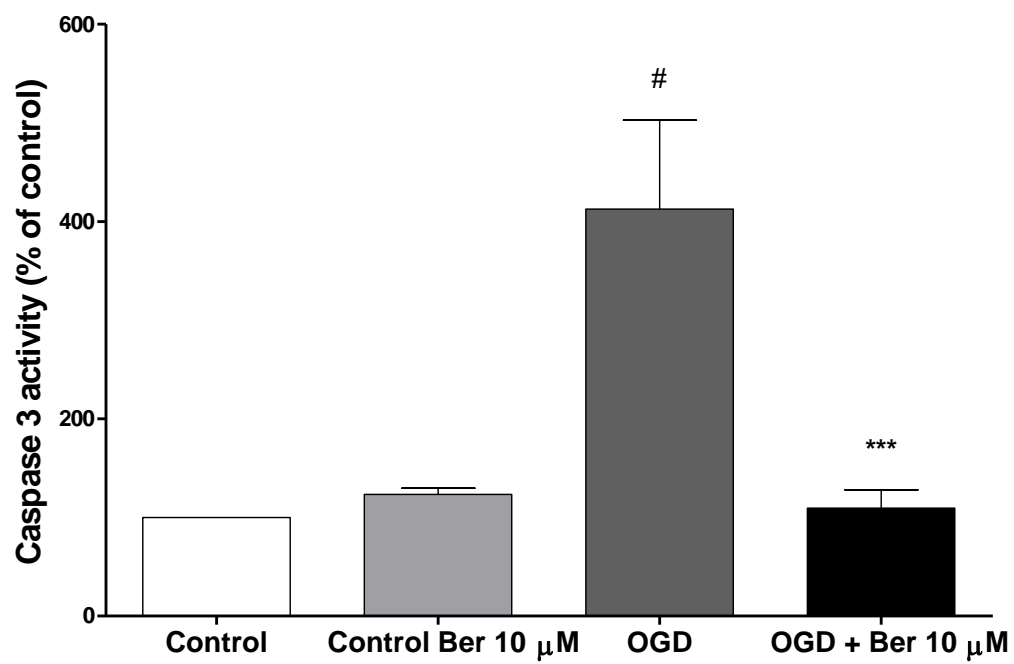


Fig.5.



## **CAPÍTULO 2**

### **BERBERINE MODULATES INFLAMMATORY RESPONSE AND ROS PRODUCTION AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN VITRO**

Elisa Nicoloso Simões Pires, Rudimar Luiz Frozza, Juliana Bender Hoppe, Bruna de  
Melo Menezes, Cristiane Matté and Christianne Gazzana Salbego

**Periódico:** Journal of Neuroinflammation

**Status:** a ser submetido

**BERBERINE MODULATES INFLAMMATORY RESPONSE AND ROS PRODUCTION AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN VITRO**

Elisa Nicoloso Simões Pires<sup>1</sup>, Rudimar Luiz Frozza<sup>1</sup>, Juliana Bender Hoppe<sup>1</sup>, Bruna Menezes<sup>2</sup>, Cristiane Matté<sup>1</sup> and Christianne Salbego <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding Author:

Christianne Salbego (salbego@terra.com.br)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 - Anexo I, Laboratório 37, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: +55 (51) 3308.5570 ; FAX: +55 (51) 3308.5535

## **Abstract**

Brain ischemia followed by reperfusion causes neuronal death related to inflammation factors release and oxidative damage. Berberine is an alkaloid widely known for its anti-inflammatory action. Due to this propriety, we presently evaluated if berberine modulates post-ischemic inflammation such as the activation and accumulation of glial cells and, also, cytokines and reactive oxygen species (ROS) productions. Our results showed organotypic hippocampal culture (OHC) treated with berberine after 1 hour explosion to oxygen and glucose deprivation (OGD) and 24 hours recovery had a decrease GFAP and Isolectin-B4 labeling, which are astrocyte and microglial markers, respectively. In addition, OHC berberine-treated attenuated TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  secretion after 24 hours OGD recovery, as well as significantly decreased the generation of ROS when compared to control slices. These results support that berberine could be used as a therapeutic agent in global cerebral ischemia and suggest that inflammatory response and ROS modulation contributes, at least in part, to berberine-induced neuroprotection.

*Keywords:* Oxygen and glucose deprivation; berberine; neuroprotection; glial cells; cytokines; reactive oxygen species

## 1. Introduction

Berberine (Ber) is an alkaloid isolated from medicinal herbs such as *Berberis* sp. and has multiple therapeutic actions. Several studies have demonstrated the anti-inflammatory effect of the molecule in different pathologies [1], and related this property with its neuroprotective action in diseases such as cerebral ischemia [2-3] and Alzheimer's disease [4-5].

Ischemic cell death is initiated by cellular changes that result in degeneration through excitotoxic mechanisms such as the expression of apoptotic proteins and cytotoxic enzymes as well as the up-regulation of stress-signaling pathways [6-7]. These damaging processes can lead to gene activation and subsequent synthesis of proteins such as cytokines, inducible cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide (NO) and synthase (iNOS) [8-9]. These molecules are produced by endothelial cells, astrocytes, microglial cells and leukocytes. Similarly, cytokines such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) are also important mediators of the inflammatory response in cerebral ischemia. Expression of IL-1 increased after transient or permanent cerebral ischemia in microglia, astrocytes and neurons [10-11].

In the same way, during the reperfusion period after ischemia, increased oxygen supply results in overproduction of reactive oxygen species (ROS), which are involved in the process of cell death. ROS, such as superoxide anions, hydroxyl free radicals, hydrogen peroxide and nitric oxide are produced as a consequence of metabolic reactions and central nervous system activity [8]. These reactive species are directly involved in oxidative damage of cellular macromolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids in ischemic tissues, which lead to cell death [12].



Furthermore, it is now clear that the efficacy of neuroprotective agents is greater if they target not only one single aspect of the ischemic cascade, but multiple mechanisms such as combined inhibition of neuronal cell death and of the detrimental effects of neuroinflammation after stroke. Our hypothesis was to determine if Ber could modulate cytokines liberation and regulated glial activation in an *in vitro* model of oxygen and glucose deprivation which simulates a cerebral ischemia.

## **2. Experimental procedures**

### *2.1. Organotypic Hippocampal Cultures*

Organotypic hippocampal cultures were prepared according to the method of Stoppini et al., 1991 [13] with some modifications [14]. The local Animal Care Committee approved all animal procedures used. Hippocampal slices were obtained from 6–8-day-old Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400  $\mu\text{m}$ ), using a McIlwain tissue chopper. Slices were separated in a Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco) supplemented with 25 mM HEPES, 1% Fungizone and 36  $\mu\text{l}/100\text{ ml}$  gentamicin, pH 7.2. Six slices were placed on one Millicell culture insert (Millicell- CM, 0.4  $\mu\text{m}$ ) and the inserts were transferred to a six-well culture plate (Cell Culture Cluster, TPP) with 1 ml of culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM) (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with glucose 36 mM, glutamine 2 mM, HEPES 25 mM and  $\text{NaHCO}_3$  4 mM (final concentrations). Fungizone 1% and gentamicin 36  $\mu\text{l}/100\text{ ml}$  were added to the medium. The pH was adjusted to 7.3 and immediately after the solution was filtered (Millex-GS, Millipore). The plates were then placed in an

incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed twice a week and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

### 2.2. Oxygen and Glucose Deprivation (OGD)

The induction of OGD was based on the method described by Strasser and Fischer, 1995 [15] with some modifications [16]. Cultures were carefully rinsed three times with OGD medium composed by: CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM, KCl 5.36 mM, NaCl 136.9 mM, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.34 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.44 mM, HEPES 25 mM, pH 7.2. Slices were left in 1 ml of this medium for 15 min, and then the medium was exchanged by one with the same composition previously bubbled with nitrogen for 30 min. The cultures were transferred to an anaerobic chamber at 37°C in which the oxygen was replaced by nitrogen, and left in these conditions for 60 min. Slices were washed three times with HBSS and treated with 10 µM of Ber (Sigma) diluted in water added to the culture medium. After, the plates returned to usual culture conditions for 24 h recovery time.

### 2.3. Slice preparation and immunofluorescence

OHC were rinsed with PBS pH 7,4 and fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h at room temperature, blocked 2 h at room temperature in 3% BSA and incubated overnight at 4°C with biotinylated Isolectin-B4 (1:500, Sigma), or anti-GFAP (1:2000, Sigma). After rinsing in PBS, slices were incubated with, alexafluor 594 (1:500, Invitrogen) or alexafluor 488 (1:500, Invitrogen) for 1 h at room temperature, mounted

DPX Mounting Medium and analyzed under a Olympus confocal laser-scanning microscope.

### *2.3. Quantification of TNF $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ release*

After 24 h of OGD recovery, organotypic hippocampal cultures media were collected, rapidly frozen and stored at -20°C for later measurement of TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  levels using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

### *2.5. ROS measurement*

After 24 hours of OGD recovery, hippocampal slices were washed with HBSS pH 7.4 and added 30  $\mu$ M DCF-DA (2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate). Slices were incubated at 37°C in the dark for 30 minutes. This fluorophore diffuses through cell membrane and is subsequently enzymatically deacetylated by intracellular esterases to the non-fluorescent DCF-H. Some oxidizing molecules as peroxynitrite, nitric oxide and hydrogen peroxide have been reported to convert DCF-H to the highly fluorescent DCF (Possel et al., 1997). After the incubation time, the intensity of DCF fluorescence were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter. Images were captured and analyzed using Scion Image software ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)). The area where DCF fluorescence was detectable above background levels was determined using the "density slice" option of Scion Image software and compared to the total slice area to obtain the percentage of damage.

## 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed by Tukey's test (GraphPad Prism software 5.0). Differences between mean values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Berberine modulates the activation of glial cells after OGD.

In order to investigate the effect of Ber treatment on glia activation after 24 h OGD recovery, we performed immunohistochemistry using GFAP-specific antibody (astrocyte) and Isolectin-B4 (microglia). After OGD, the level of GFAP clearly increased in OGD hippocampal slice (Fig. 1 B2), whereas in Ber-treated slices fewer positive GFAP were observed on representative immunohistochemistry photographs (Fig. 1 B3). Accordingly, same results are obtained using Isolectin-B4 staining (Fig. 1 C3 and C4, respectively).

### 3.2. Berberine acts on inflammatory responses in OHC after OGD

As Ber is well known for its anti-inflammation action, we investigated its effect on the release of some inflammatory cytokines observed after the exposure to OGD condition. As can be seen in figure 2A and 2B, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were increased in the culture medium after 1 h exposure to OGD and also at 24 h of recovery when compared to control culture. In cultures treated with Ber and exposed to OGD, we observed a lower release of these cytokines, which suggests an anti-inflammatory effect (Fig. 2A and B).

### 3.3. Ber-mediated neuroprotection is related to the lower ROS production

Neuronal damage following brain ischemia involves various mechanisms, among which reactive oxygen species-mediated processes play a central role. The injurious effect of free radicals in brain ischemia is evident from studies demonstrating that free radical scavengers confer protection from ischemic damage (Chan, 2001). The fluorogenic compound DCFH-DA is one of the most prominent markers to reflect the overall oxidative status in cells.

As shown in Fig. 3B, slices that undergone OGD for 1 h followed by 24 h of recovery exhibited over 100% increase in free radicals production as compared with control slices. The treatment with Ber induced a decrease of this production, which was lower than that observed in control slices.

#### 4. Discussion

Our present study showed a neuroprotective effect of berberine against damage induced by the exposure of organotypic hippocampal cultures to oxygen and glucose deprivation, through the decrease of astrocyte and microglia activation. In addition, the glia cells promote pro-inflammatory factors release, such as chemokines, cytokines, prostaglandins, proteinases, ROS and NO. Our data demonstrated that berberine attenuate the inflammatory response by decreasing TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels and ROS formation.

Microglial cells have a close interaction with neurons and play an important role in host defense. As the primary immune cell in CNS, they play a dual role in cellular response to neuronal injury: a pathogenic role that initiates inflammation and exacerbates degeneration and a neuroprotective role [17]. Reactive microglia secretes a variety of molecules, such as glutamate, cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5), matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, MMP-9), free radicals (superoxide, NO) and eicosanoids (PGD<sub>2</sub>, leukotriene C<sub>4</sub>), that can act synergistically with the lesion to exacerbate cell damage [18]. Also, these cells start to express a new range of genes and proteins, including iNOS, COX-2 and MHC class II and complement [19]. The decrease in Isolectin B4 binding in organotypic hippocampal cultures exposed to OGD and treated with Ber, observed in the present work, suggests that Ber was able to reduce the glial activation.

After several conditions such as brain injury, for example, astrocytes undergo astrogliosis, which is characterized by an increase in GFAP, vimentin and nestin expression, by cellular hypertrophy, and/or the process of extension and interdigitation, or by cell proliferation and by secretion of a variety of cytokines. In addition, reactive astrocytes form a glial scar which obstructs neurite outgrowth and axonal

regeneration and communication [20]. The most remarkable biochemical change observed during astrogliosis is the GFAP upregulation, that is almost universally recognized as a marker of reactive astrocytes. Reactive astrocytes may also exacerbate tissue damage by releasing of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and by producing and releasing arachidonic acid metabolites, NO, and reactive oxygen species (ROS). It is important to mention here that in spite of microglia producing of these cell damaging intermediates is much higher than astrocytes, they certainly contribute to cell death [20]. Our data corroborate with study which showing the anti-inflammatory action of berberine [1] including after cerebral ischemia [21].

These results are in agreement with other studies, which have found an early increase in ROS-generating enzymes like COX-2 and NOS [9] after an ischemic episode. Here we observed that Ber-treatment decreased DCF levels which were increased on OGD exposure cultures, an effect that could be attributed to its ability to scavenge ROS, indicating that the neuroprotection conferred by Ber is also due, at least in part, to its anti-oxidative effect of attenuating ROS. A number of studies have demonstrated the antioxidant properties of Ber, for example, its ability to inhibits norepinephrine-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes [22], by improvement of human endothelial function [23] and to ameliorates pro-inflammatory cytokine-induced endoplasmic reticulum stress in human intestinal epithelial cells [24].

To our knowledge, our study is the first to use an OGD model, to mimic an ischemic event, for explore the interrelation between Ber's neuroprotective effect and glial reactivity and the release of inflammatory molecules and the ROS formation. This results provide evidence that berberine induces its effect in the protection against ischemia damage with a more complex mechanism that also involves anti-inflammatory and anti-oxidative properties.

TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are important mediators of the inflammatory reactions in cerebral ischemia. Secretion of cytokines after ischemia is widely described, resulting in the

phosphorylation and activation of cell death pathway targets, such as NF $\kappa$ B and MAPK [25].

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPERGS, CNPq and CAPES.



## 5. References

- [1] Kulkarni SK, Dhir A; Berberine: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders *Phytother. Res* 2010, 24:317–324.
- [2] Wang F, Zhao G, Cheng L, Zhou HY, Fu LY, Yao WX; Effects of berberine on potassium currents in acutely isolated CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Brain Res* 2004, 999: 91–97.
- [3] Yoo KY, Hwang IK, Lim BO, Kang TC, Kim DW, Kim SM, Lee HY, Kim JD, Won MH; Berberry extract reduces neuronal damage and N-Methyl-D-aspartate receptor 1 immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Biol Pharm Bull* 2006, 29: 623–628
- [04] Zhu F, Qian C; Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 2006, 7: 78.
- [5] Ji HF, Shen L; Berberine: a potential multipotent natural product to combat Alzheimer's disease. *Molecules* 2011, 16(8):6732-40. doi: 10.3390/molecules16086732.
- [6] Lipton P; Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *physiol rev* 1999, 79( 4):1431-1568.
- [07] Mehta SL, Manhas N, Raghubir R; Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 2007, 54:34-66.
- [08] Chan PH; Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow and Metabol* 2001, 21:2-14.
- [09] Simão F, Matté A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG; Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following

global cerebral ischemia. *Neurochem Int* 2012, 5:659-65. doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.009. Epub 2012 Jun 16.

[10] Becker KJ; Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol* 2001, 14:349–353.

[11] del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ; Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 2000, 10:95–112.

[13] Stoppini L, Buchs PA, Muller D; A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Meth* 1991, 37:173-182.

[14] Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG; Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neurosci* 2003, 118:379-386.

[15] Strasser U, Fischer G; Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Meth* 1995, 57:177-186.

[16] Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, Rocha, E, Salbego C; An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett* 2001, 315:33–36.

[17] Sriram K, O’Callaghan JP; Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007, 2:140-153.

[18] Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK; Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17:942-964.

- [19] Brown GC; Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007, 35:1119-1121.
- [20] Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW; Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004, 89:1092-1100.
- [21] Zhang X, Zhang X, Wang C, Li Y, Dong L, Cui L, Wang L, Liu Z, Qiao H, Zhu C, Xing Y, Cao X, Ji Y, Zhao K; Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- $\kappa$ B expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res* 2012, 1459:61-70. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.065.
- [22] Lv XX, Yu XH, Wang HD, Yan YX, Wang YP, Lu DX, Qi RB, Hu CF, Li HM Berberine inhibits norepinephrine-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes via inhibiting ROS-TNF- $\alpha$ -caspase signaling pathway. *Chin J Integr Med.* 2012, [Epub ahead of print]
- [23] Cheng F, Wang Y, Li J, Su C, Wu F, Xia WH, Yang Z, Yu BB, Qiu YX, Tao J; Berberine improves endothelial function by reducing endothelial microparticles-mediated oxidative stress in humans. *Int J Cardiol* 2012, 35(3):841-9. doi: 10.1007/s10753-011-9385-6.
- [24] Hao X, Yao A, Gong J, Zhu W, Li N, Li J; Berberine ameliorates pro-inflammatory cytokine-induced endoplasmic reticulum stress in human intestinal epithelial cells in vitro. *Inflammation.* 2012, 35(3):841-9. doi: 10.1007/s10753-011-9385-6.
- [25] Lambertsen KL, Biber K, Finsen B; Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. 2012, 32(9):1677-98. doi: 10.1038/jcbfm.2012.88.

## Legends of figures

**Fig. 1.** Administration of Ber after OGD on OHC decrease GFAP and Isolectin-B4 labeling. Representative pictures of OHC slices marked with (A) Dapi, (B) anti-GFAP and (C) Isolectin-B4. OGD-alone culture demonstrated an increased GFAP (B2) and Isolectin-B4 (C2) staining when compared to control slices (B1 and C1). OGD Ber-treated culture (B3 and C3) after 1 hour exposition and 24 hours recovery showed a decreased GFAP and Isolectin-B4 staining when compared to OGD-alone culture (B2 and C2), respectively (magnification: 100x/400x).

**Fig. 2.** Ber neuroprotection effect on TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. (A) The average level of TNF $\alpha$  was increased on OGD alone culture after 24 h recovery when compared to control. After 1 hour OGD, Ber treatment significantly decreased TNF $\alpha$  level when compared to OGD-alone. (B) In the same way, OGD Ber-treated IL-1 $\beta$  levels had the same result as TNF $\alpha$  when compared to control slices. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M., n =8. #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone; p < 0.05 (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

**Fig. 3.** Ber modulates ROS generation. (A) Representative pictures of OHC slices stained with DCF after treatment 10  $\mu$ M of Ber and after 24 h recovery (magnification: 40x). (B) DCF fluorescence quantification from pictures showed in (A). Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M., n = 12. #Significantly different from control cultures and \*significantly different from cultures exposed to OGD alone; p < 0.05 (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Fig. 1.

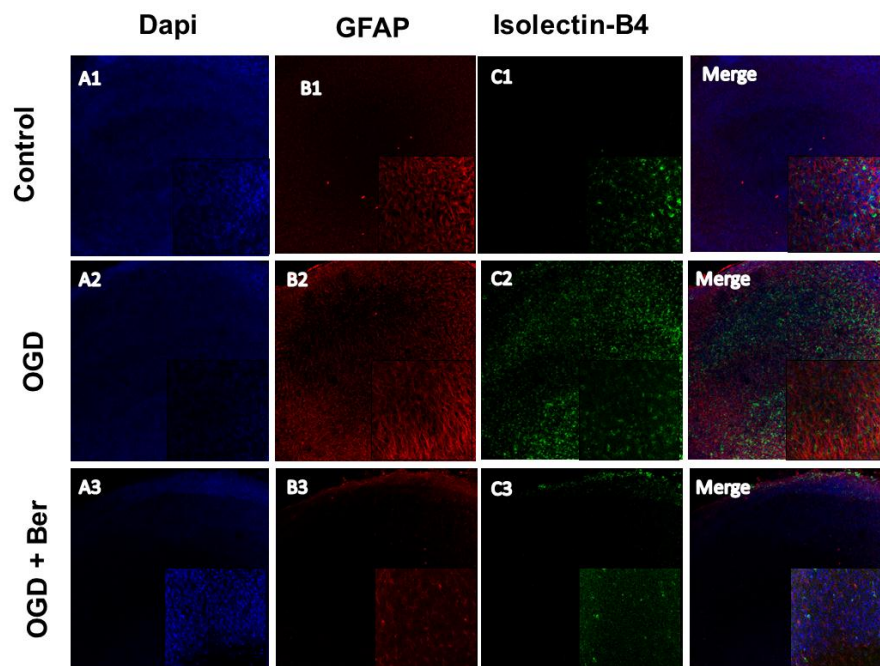


Fig. 2.

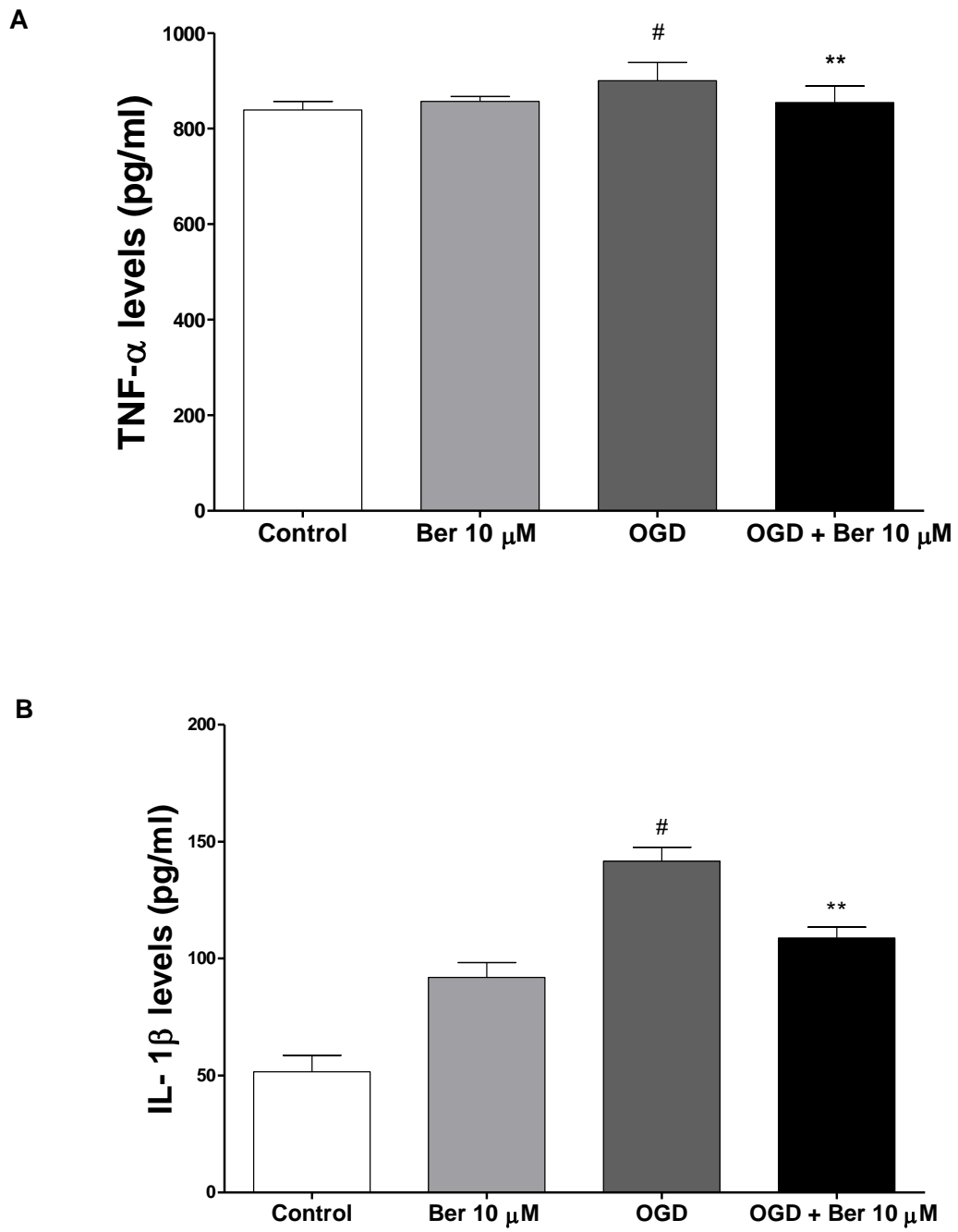
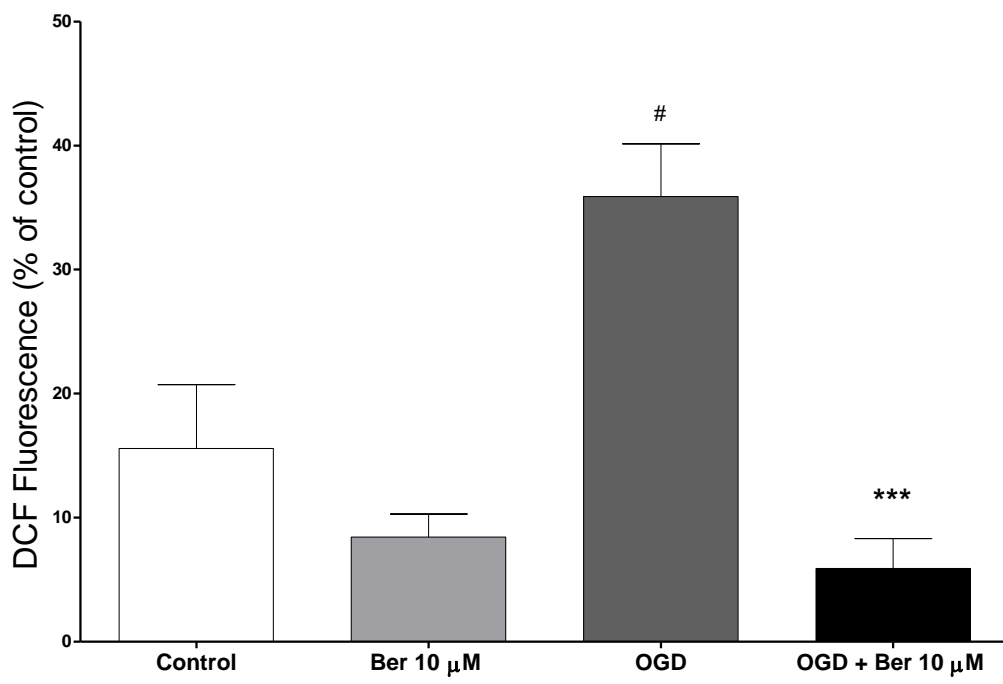
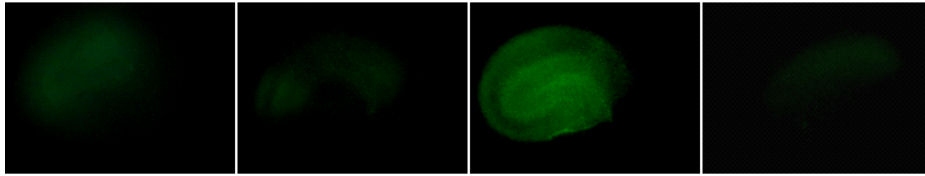


Fig. 3



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação mostram o efeito neuroprotetor da berberina administrada após insulto isquêmico por privação de oxigênio e glicose (POG) em cultura organotípica de hipocampo de ratos. Esta ação parece ser mediada pela ativação da sinalização de sobrevivência celular e bloqueio de efetores de morte por apoptose. Ainda, foi capaz de diminuir ativação glial e, conseqüente, indução de resposta inflamatória e produção de EROS. Este conjunto de resultados nos permite sugerir uma alternativa para o desenvolvimento de nova estratégia terapêutica para o tratamento e/ou prevenção do dano celular induzido por um evento isquêmico. Isto se torna bastante relevante quando se considera que este tipo de lesão neurodegenerativa possui alta frequência e morbidade.

A berberina vem sendo usada há vários anos na medicina popular chinesa e indiana, e por outro lado, vários estudos já demonstraram a diversas ações terapêuticas da berberina (Kulkarni e Dhir, 2010). A descrição de efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas tais como Doença de Alzheimer (Zhu e Quian, 2006), isquemia cerebral (Zhou et al., 2008; Cui et al., 2009; Zhang et al., 2012), tumores cerebrais (Chan et al., 2009), depressão mental (Kuznetsova et al., 2005) e esquizofrenia (Tarrago, 2007), tem renovado o interesse sobre os efeitos da berberina no organismo. Somado a isso, a propriedade da molécula deste alcaloide em atravessar a BHE e de interagir com neurotransmissores e receptores cerebrais fazem da berberina uma molécula bastante promissora a ser somada ao arsenal terapêutico para o tratamento das doenças que afetam o sistema nervoso central. Estudos realizados em modelos animais, tanto *in vitro* como *in vivo*, mostram além do efeito neuroprotetor da Ber, seus efeitos anti-inflamatório, cardioprotetor, melhora na diabetes e antioxidante (Lv et al., 2012; Di Pierro et al., 2012; Zhu e Qiu, 2006).



Os estudos *in vitro*, apesar das suas limitações, são ferramentas importantes para o estudo controlado de interações entre células e de toxicidade de substâncias. A cultura organotípica de hipocampo é amplamente utilizada para esse fim (Sundstrom et al., 2005) e muitos estudos de morte celular (Valentim et al., 2003; Horn et al., 2005; Cavaliere et al., 2006; Frozza et al., 2009) e de ativação microglial e inflamação (Wang et al., 2007; Strassburger et al., 2008) já foram validados e realizados nesse modelo, o que justifica sua utilização nesse trabalho.

Os dois capítulos dessa dissertação buscaram compreender mais sobre as propriedades neuroprotetoras da Ber no modelo de *in vitro* de isquemia, pela exposição de culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas a POG. Utilizamos o tratamento pós-OGD para avaliar a neuroproteção frente à morte tardia, característica neste tipo de lesão. Nossos resultados estão de acordo com os já encontrados na literatura em modelos de isquemia *in vitro* com utilização de células PC12 e cultura organotípica de camundongos (Zhou et al., 2008), porém em relação a este último, obtivemos resultados semelhantes com a utilização de uma menor dose de Ber.

No primeiro capítulo, mostramos a ação protetora da Ber primeiramente pela diminuição da morte celular após 24 horas de recuperação, através da diminuição da incorporação do corante iodeto de propídeo (IP) pelas células neurais. Em um modelo de isquemia focal *in vivo*, Zhang e colaboradores demonstraram em 2012, que esta ação está relacionada com o aumento da fosforilação da proteína Akt, envolvida com a via de sinalização de sobrevivência celular, e de seus substratos GSK-3 $\beta$  e CREB. De acordo, nossos resultados também mostram que o tratamento com Ber foi capaz de aumentar a fosforilação da Akt, além dos níveis basais, e de GSK-3 $\beta$  nas culturas submetidas à POG.

Além disso, um dos mecanismos-chave para morte tardia após uma isquemia cerebral é a ativação da rota da morte celular por apoptose e, grande parte desta

ação, age na indução de caspases, principalmente a caspase-3 (Lipton, 1999; Mehta et al., 2007). Estudo realizado em células PC12 submetidas a um modelo de isquemia por POG e tratadas com Ber, mostraram a diminuição do número de células apoptóticas e, ainda, a liberação de citocromo *c* (ativador de apoptose caspase-dependente) e do fator indutor de apoptose (AIF) mitocondrial (Zhou et al., 2008). Já a o tratamento com Ber em cultura organotípica de camundongo, em um mesmo modelo de lesão, foi capaz de aumentar a fosforilação de Bcl-2, proteína que já demonstrou efeito benéfico contra morte celular por necrose e apoptose em resposta a vários estímulos, incluindo exposição ao glutamato e isquemia (Cui et al., 2009). Assim como os dados já descritos, nossos resultados mostram a ação da Ber em diminuir a fosforilação da proteína sinalizadora JNK; a qual atua sobre a via da apoptose, e, a ativação da caspase-3. Estes resultados combinados sugerem o efeito neuroprotetor da Ber sobre a ativação da via sinalizadora de sobrevivência celular e, em paralelo, a inibição da via de morte por apoptose.

Uma das características mais proeminentes da Ber é seu caráter anti-inflamatório e este fato tem sido demonstrado em diversos estudos (Kulkarni e Dhir, 2010; Zhang et al., 2012). Com o intuito de aumentar a investigação sobre os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor induzido pela Ber, focalizamos na ação anti-inflamatória da Ber em nosso modelo experimental. A inflamação é uma resposta complexa envolvendo a regulação e ativação rápida de uma variedade de proteínas e genes. Após um insulto isquêmico, células da glia (astrócitos e microglia) são ativadas e iniciam a secreção de moléculas que são capazes de induzir a excitotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo. Dentre as moléculas secretadas estão o glutamato, citocinas (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), quimiocinas, prostaglandinas e radical superóxido (Liberato et al., 2004; Wang et al., 2007; Buffo et al., 2008; Simão et al., 2011).

O processo da astrogliose reativa e/ou “cicatriz glial” ocorre através da ativação dos astrócitos e, então, induzem o aumento da expressão da proteína GFAP (Wang et

al., 2007; Silver e Miler, 2004). Os resultados descritos no capítulo 2 mostraram que o tratamento da cultura exposta à POG e tratada com Ber foi capaz de reduzir a ativação astrocitária pela menor marcação do anticorpo anti-GFAP. Além disso, o tratamento com Ber foi capaz de diminuir a ativação da microglia, como observado pela diminuição da reatividade com a Isolectina-B4. Nossos resultados nos permitem propor que o efeito neuroprotetor da Ber deve-se, também, da diminuição da ativação glial.

Como citado anteriormente, a ativação glial desencadeia a secreção de moléculas pró e anti-inflamatórias. TNF $\alpha$  é uma citocina liberada pela microglia ativada, pelos astrócitos reativos e pelos neurônios. Em grandes quantidades sabe-se que é um importante causador de neurotoxicidade, basicamente por induzir a apoptose nas células através de seus receptores específicos e de alterar a integridade da BHE, facilitando a infiltração das células do sistema imunológico (Sriram e Callaghan, 2007). Da mesma forma, a IL-1 $\beta$  é um mediador de resposta inflamatória e secretado pelas células glias ativadas e neurônios após lesões. Os possíveis mecanismos de ação desta citocina é a liberação de ácido araquidônico, aumento da excitotoxicidade mediada por NMDA e estimulação da oxido nítrico sintase (Sayre et al., 2008). Assim como em estudos prévios, foi observado em nosso trabalho o aumento destes marcadores inflamatórios após o modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

Após serem tratadas com Ber, observamos que nas fatias submetidas à POG houve uma diminuição significativa na liberação de TNF $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ . Estes dados estão de acordo com os resultados que demonstraram a ação da Ber sobre a diminuição da fosforilação do fator de transcrição NF $\kappa$ B (Zhan et al., 2012), o qual possui importante envolvimento na sinalização da inflamação após insulto isquêmico.

Uma pesquisa na literatura mostra que este trabalho foi o primeiro a mostrar a ação da Ber na resposta inflamatória após a indução de lesão isquêmica no tecido cerebral, demonstrando o envolvimento das células glias e a secreção de moléculas pró-inflamatórias.

Outra consequência da ativação de células como astrócitos e microglia e liberação de citocinas, em decorrência da excitotoxicidade desencadeada pela isquemia, é a formação de espécies reativas do oxigênio (EROS) (Sayre et al., 2008; Simão et al., 2012). O cérebro é particularmente vulnerável ao ataque de espécies reativas devido à sua limitada defesa antioxidante. Já foi demonstrado pelo nosso grupo que a isquemia diminui as defesas oxidantes e, em consequência, aumenta o dano neuronal no córtex e hipocampo de ratos (Simão et al., 2011). Foi demonstrado a ação neuroprotora da Ber, em modelo *in vivo* de Doença de Alzheimer, através do seu efeito antioxidante (Zhu e Quian, 2006). Com isso, a remoção de espécies reativas geradas durante o período da isquemia, parece ser uma abordagem viável para a neuroproteção. Como observado no capítulo dois, a formação de EROS teve um aumento maior de 100% nas culturas submetidas à POG. Após o tratamento com Ber, essa formação foi reduzida significativamente abaixo dos níveis de controle. Tal observação sugere que a Ber pode ser um agente protetor viável para condições onde o dano celular é ocasionado por estresse oxidativo.

Os resultados obtidos nesse trabalho descrevem que o potencial neuroprotetor da berberina pode estar relacionado com a ativação da via de sobrevivência celular e bloqueio da via da apoptose. Ainda, a diminuição da lesão celular pode estar relacionada com a diminuição neuroinflamação e de produção de espécies reativas do oxigênio.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permite concluir que:

1. O tratamento com berberina após uma hora de exposição à privação de oxigênio e glicose e recuperação de 24 horas:

- Conferiu menor morte celular, principalmente nas regiões de CA1, verificada pela diminuição da incorporação de iodeto de propídio;
- Ativou a via de sobrevivência celular, pelo aumento da fosforilação da proteína Akt e seu substrato GSK-3 $\beta$ ;
- Diminuiu a ativação da morte por apoptose, através da ação sobre a proteína sinalizadora JNK e caspase-3;
- Reduziu a ativação de astrócitos e microglia, pela diminuição da marcação da proteína GFAP e reatividade da Isolectina-B4, respectivamente;
- Diminuiu, também, os níveis das citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  secretadas no meio de cultivo;
- Teve a produção de EROS reduzida, observada pela fluorescência produzida pela reação do DCF-DH.

## 7. PERSPECTIVAS

Como continuação deste trabalho, pretende-se trabalhar com os seguintes objetivos:

- Avaliar maior envolvimento de proteínas sinalizadoras da via PI3K/Akt; bem como integração das vias de apoptose e inflamação (NFκB), com utilização de inibidores destas;
- Verificar o efeito da berberina na produção de EROS pelos ensaios de TBARS e TRAP, enzimas anti e pró-oxidantes, como iNOS, SOD e catalase;
- Investigar o efeito da administração de berberina *in vivo* após a isquemia cerebral global. Assim, avaliar os parâmetros já analisados condiz com este modelo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hamid KM, Tymianski M (1997). Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. *J Neurosci.* 17:3538-3553.

Araujo SA, Pacheco SS, Oliveira AG, Imaizumi C, Abreu LC (2008). A hipotermia como estratégia protetora de encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos com asfixia perinatal. *Ver Bras Crescimento Desenvolvimento Hum.* 18(3):346-358.

Becker KJ; Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol* 2001, 14:349–353.

Benakis C, Bonny C, Lorenz H (2009). JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia. *Brain, Behavior, and Immunity* 24: 800–811

Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 8:57-69.

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3581-3586.

Chan PH (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow and Metabol.* 21:2-14.

Chen TC, Lai KC, Yang JS, Liao CL, Hsia TC, Chen GW, Lin JJ, Lin HJ, Chiu TH, Tang YJ, Chung JG (2009). Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest and apoptosis in C6 rat glioma cells. *Int J Oncol.* 34(6):1681-90.

Cimarosti H, Zamin LL, Frozza R, Nassif M, Horn AP, Tavares AA, Netto CA, Sabego C (2005). Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 $\beta$ . *Neurochem Res.* 30:191-199.

Cui HS, Matsumoto K, Murakami Y, Hori H, Zhao Q, Obi R (2009). Berberine Exerts Neuroprotective Actions against in Vitro Ischemia- Induced Neuronal Cell Damage in Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Involvement of B-Cell Lymphoma 2 Phosphorylation Suppression *Biol. Pharm. Bull.* 32:79-85.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-397.

Engelhardt B, Ransohoff RM (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26:485-495.

Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG (2009). A comparative study of  $\beta$ -amyloid peptides A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res.* 34:295-303.

Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20:471-477.

Gulfraz M, Mehmood S, Ahmad A, Fatima N, Praveen Z, Williamson EM (2008). Comparison of the antidiabetic activity of *Berberis lyceum* root extract and berberine in alloxan-induced diabetic rats. *Phytother Res* 22: 1208–1212.

Hall AA, Leonardo CC, Collier LA, Rowe DD, Willing AE, Pennypacker, KR (2009). Delayed Treatments for Stroke Influence Neuronal Death in Rat Organotypic Slice Cultures Subjected to Oxygen Glucose Deprivation. *Neuroscience.* 164(2): 470–477. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.051.



He F, Sun YE (2007). Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 39:661-665.

Heyen JR, Ye S, Finck BN, Johnson RW (2000). Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res.* 77(1):138-47.

Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim L, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego C (2005). Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res.* 30:355-361.

Koutsilieris E, Scheller C, Tribl F, Riederer P (2002). Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. *Parkinsonism Relat Disord.* 8:401-406.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M and Verkhratsky A (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 9(2):461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.

Kulkarni SK, Dhir A (2010). Berberine: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Central Nervous System Disorders *Phytother. Res.* 24:317–324.

Lambertsen KL, Biber K, Finsen B; Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. 2012, 32(9):1677-98. doi: 10.1038/jcbfm.2012.88.

Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89:1092-1100.

Lipton P (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *physiol. rev.* 79( 4):1431-1568.

Lv XX, Yu XH, Wang HD, Yan YX, Wang YP, Lu DX, Qi RB, Hu CF, Li HM. 2012. Berberine inhibits norepinephrine-induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes via inhibiting ROS-TNF- $\alpha$ -caspase signaling pathway. *Chin J Integr Med.*

McGeer PL, McGeer EG (2002). Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J Neurovirol.* 8(6):529-38.

Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics *Brain Res. Rev.* 54:34-66.

Ministério da Saúde Brasil (2008). Saúde Brasil 2007 - Uma análise da situação da Saúde: Perfil da mortalidade do brasileiro. Brasília, 06 de novembro de 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva\\_saude\\_061008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf)> .

Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza RL, Zamin LL, Simão F, Horn AP, Salbego C (2007).  $\beta$ -Amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 $\beta$ , and PTEN. *Neurochem Int.* 50:229-235.

Norberg J, Kristensen BW, Zimmer J (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Prot.* 3:278-290.

Norberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4:435-452.

Organização Mundial da Saúde - WHO (2013). Enfermedades cardiovasculares. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

Pan GY, Wang GJ, Liu XD, Fawcett JP, Xie YY (2002). The involvement of P glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacol Toxicol* 91: 193–197.

Pradhan S, Andreasson K (2013). Commentary: Progressive inflammation as a contributing factor to early development of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 241:148-55. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.12.008. Epub 2012 Dec 21.

Qiu F, Zhu Z, Kang N, Piao S, Qin G, Yao X (2008). Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and humans. *Drug Metab Dispos* 36: 2159–2165.

Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 17:942-964.

Rossi S, Studer V, Motta C, De Chiara V, Barbieri F, Bernardi G, Centonze D (2012). Inflammation inhibits GABA transmission in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 18(11):1633-5. doi: 10.1177/1352458512440207. Epub 2012 Mar 14.

Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K, Ojala J (2009). ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation.* doi: 10.1186/1742-2094-6-41.

Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 21:172-188.

Seth P, Koul N (2008). Astrocytes, the star avatar: redefined. *J Biosci* 33:405-421.

Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 4:599-636.

Silver J, Miller JH (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5:146-156.

Simão F, Matté A, Matté C, Soares FMS, Wyse ATS, Netto CA, Salbego C (2011). Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutri Biochem.* 22:921-928.

Simão F, Matté A, Pagnussat AS, Netto CA, Salbego CG. 2012. Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following

global cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 5:659-65. doi: 10.1016/j.neuint.2012.06.009. Epub 2012 Jun 16.

Sriram K, O'Callaghan JP (2007). Divergent roles of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2:140-153.

Stoppini L, Buchs P-A, Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous system. *J Neurosci Meth.* 37:173-182.

Strassburger M, Braun H, Reymann KG (2008). Anti-inflammatory treatment with the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB239063 is neuroprotective, decreases the number of activated microglia and facilitates neurogenesis in oxygen-glucose-deprived hippocampal slice cultures. *Eur J Pharmacol.* 592:55-61.

Strasser U, Fischer G (1995). Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Meth.* 57:177-186.

Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *J Ame Soc Experiml NeuroTherap.* 1:17-25

Sundstrom L, Morrison B, Bradley M, Pringle A (2005). Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discov Today* 10:993-1000.

Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* (1):1-25. Epub 2007 Jul 17.

Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts ML, Valable S, Ghezzi P, Quackenbush J, Brines M, Cerami A, Probert L (2008). TNF receptor I sensitizes

neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 195:6185-90.

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG (2003). Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118:379-386.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Tesler J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:44-84.

Wang X, Wang R, Xing D, Su H, Ma C, Ding Y, Du L (2005a). Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of *Coptidis rhizoma* extract. *Life Sci* 77: 3058–3067.

Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007a). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 184:53-68.

Watters O, O'Connor JJ (2011). A role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and ischemic preconditioning. *J Neuroinflam*. 8:87.

White BC, Sullivan JM, Degracia DJ, O'neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 179:1-33.

Yoo KY, Hwang IK, Kim JD, Kang IJ, Park J, Yi JS, Kim JK, Bae YS, Won MH (2008). Antiinflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. *Phytother Res* 22: 1527–1532.

Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simão F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego C (2006). Protective effect of resveratrol against

oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of PI3K pathway. *Neurobiol Dis.* 24:170-182.

Zhang X, Zhang X, Wang C, Li Y, Dong L, Cui L, Wang L, Liu Z, Qiao H, Zhu C, Xing Y, Cao X, Ji Y, Zhao K. 2012. Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF- $\kappa$ B expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res.* 1459:61-70. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.065.

Zhou XQ, Zeng XN, Kong H, Zun XL (2008). Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci. Letters.* 447:31–36.

Zhu F, Qian C. 2006. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 7: 78.

Zipp F, Aktas O (2006). The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 29:518-527.