

ANTOCIANINAS APRESENTAM POTENCIAL NEUROPROTETOR EM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) EM ASTRÓCITOS

TAÍSE ROSA DE CARVALHO¹; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA²; SIMONE MUNIZ PACHECO³; ELIZANDRA BRAGANHOL⁴; MARIANA FREIRE BARBIERI GERZSON⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – taisecarvalho_ @hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julianahazambuja@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – simonemunizpacheco@gmail.com

⁴Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – elizbraganhol@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – mgerzson@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Antocianinas são pigmentos pertencentes ao grupo do flavonoides e são capazes de conferir a coloração violeta a diferentes vegetais e frutas (Giusti, 2009). Tais estruturas vêm demonstrando promissor efeito neuroprotetor, possivelmente devido ao seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (Kelsey, 2011). Doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Múltipla estão associadas a um ambiente inflamatório e com aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Cunningham, 2009). Esse ambiente inflamatório é prejudicial às células gliais e aos neurônios, agravando o quadro neurodegenerativo. A redução e o controle da inflamação dentro do Sistema Nervoso Central (SNC), portanto, possibilitaria uma potencial melhora do quadro clínico em pacientes com estas patologias.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de um extrato rico em antocianinas na viabilidade celular e na modulação da atividade da iNOS em culturas primária de astrócitos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente em membrana de bactérias gram negativas e que é capaz de reproduzir *in vitro* um modelo de neuroinflamação quando em contato com células gliais.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do extrato rico em antocianinas

O extrato rico em antocianinas utilizado neste estudo, obtido do fruto *Vaccinium vitis-idaea* (código GIN: 695399), foi cedido pela empresa *Christian Hansen A/S*. A análise cromatográfica revelou um pool de pelo menos quinze antocianinas no extrato sendo a cianidina- 3-O-galactosídeo a mais abundante delas (Mane et al., 2011).

2.2 Cultivo primário de astrócitos

Foi realizado o cultivo primário de astrócitos de acordo com protocolo descrito por Gottfried (Gottfried, 1999). Ratos *Wistar* com 1-2 dias de vida foram obtidos do Biotério Central da UFPel. Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética sob o número CEEA 0179. Astrócitos do córtex cerebral foram cultivados em placas de 96 poços (3×10^4 por poço) e mantidos com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

As células foram mantidas em condições padrões (5% CO₂, 37°C e atmosfera umidificada) durante 15 dias, recebendo troca periódica de meio de cultivo até receberem os tratamentos de cada ensaio realizado.

2.3 Teste de citotoxicidade do extrato

Para a avaliação da citotoxicidade das antocianinas, os astrócitos foram tratados com as concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL do extrato. As células foram expostas a essas concentrações por 24h e 48h. Ao final do ensaio, a viabilidade celular foi determinada pelo teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). DMEM foi utilizado como controle. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 492 nm e é linearmente proporcional ao número de células com as mitocôndrias ativas.

2.4 Indução do estímulo inflamatório via LPS e posterior tratamento com antocianinas

As células foram expostas à concentração de 1µg/mL de LPS durante 3h, para simular uma situação de dano inflamatório. Posteriormente as células foram tratadas com um extrato rico em antocianinas nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL, durante 24h e 48h. Após o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada via MTT e a atividade da iNOS foi inferida pela quantificação da quantidade de nitrito no sobrenadante do cultivo pelo método de Greiss (HUANG, 2009).

2.6 Avaliação estatística dos resultados

Os dados foram analisados em triplicata, utilizando o software GraphPad Prism. Todas as análises foram feitas pelo teste ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey-Kramer ou ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni quando necessário. Os valores foram considerados significativos para um valor de P<0,05. Para todos os testes, DMEM foi utilizado como controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, avaliamos o impacto da exposição às antocianinas nas concentrações de 10 a 100 µg/mL durante 24h e 48h com a finalidade de avaliar a citotoxicidade do extrato. A Figura 1 demonstra que o uso do extrato não apresentou efeito citotóxico e capacidade de alterar a viabilidade dos astrócitos em nenhum tempo ou concentração testados.

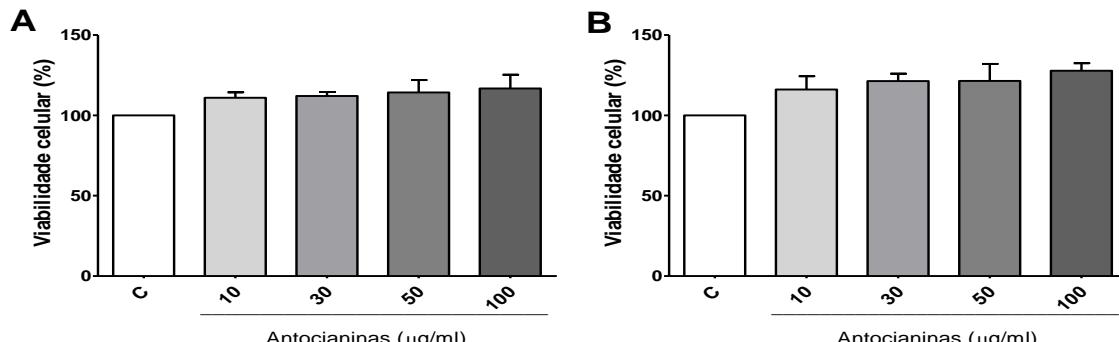


Figura 1 - Avaliação do efeito citotóxico do extrato rico em antocianinas em cultura primária de astrócitos. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes de antocianinas por 24 h (A) e 48 h (B), a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer.

Os resultados demonstram que a exposição ao LPS na concentração de 1 μ g/mL durante 24h reduziu viabilidade celular dos astrócitos de cerca de 40%, enquanto o tratamento com as antocianinas em todas as concentrações foi capaz de reverter esse efeito deletério do LPS e induziu aumento da viabilidade dos astrócitos indicando um efeito neuroprotector (Figura 2A).

Ao analisarmos em 48h (Figura 2B), podemos observar que quando os astrócitos foram estimulados com LPS ocorreu morte celular em cerca de 40%. O tratamento com as antocianinas, em todas as concentrações, foi efetivo em reverter esse efeito. Além disso, quando expostas às concentrações de 50 e 100 μ g/mL os astrócitos apresentam diferença em relação ao grupo tratado com LPS, mas são estatisticamente iguais ao controle DMEM indicando efeito protetor sobre a morte celular induzida pelo LPS e capacidade de restauração da homeostase.

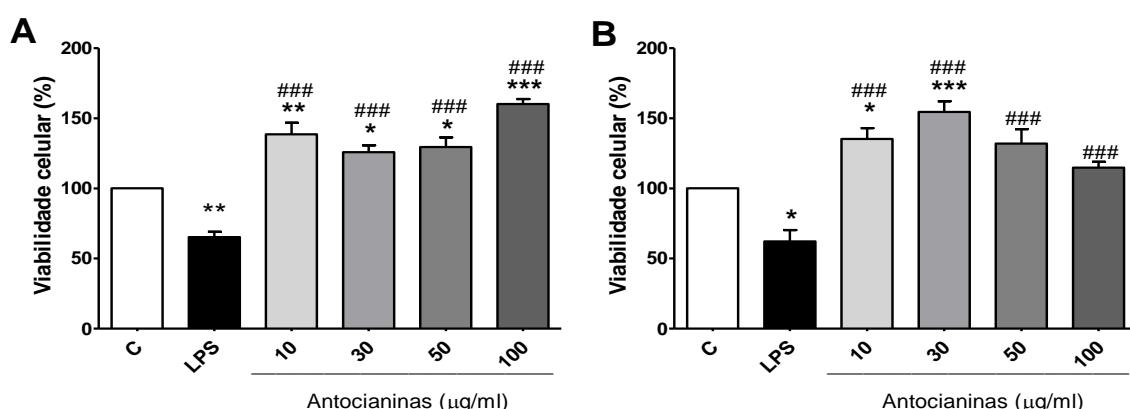


Figura 2. Avaliação do efeito sobre a viabilidade celular de um extrato rico em antocianinas em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS.. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey-Kramer. *; ** Diferença significativa das células controle ($P < 0.05$ e 0.01 respectivamente); ### Diferença significativa do LPS ($P < 0.001$) .

A exposição ao LPS em 24 e 48h (Figura 3) levou a um aumento significativo da atividade da iNOS (60% e 30% respectivamente). Em contrapartida, o aumento de óxido nítrico óxido nítrico induzido pelo LPS em 24h foi revertido pelas antocianinas nas concentrações de 30, 50 e 100 μ g/mL (Figura 3). Quando expostos por 48h as concentrações de 10, 30, 50 e 100 μ g/mL também foram capazes de reverter o aumento da atividade da iNOS induzido pelo LPS.

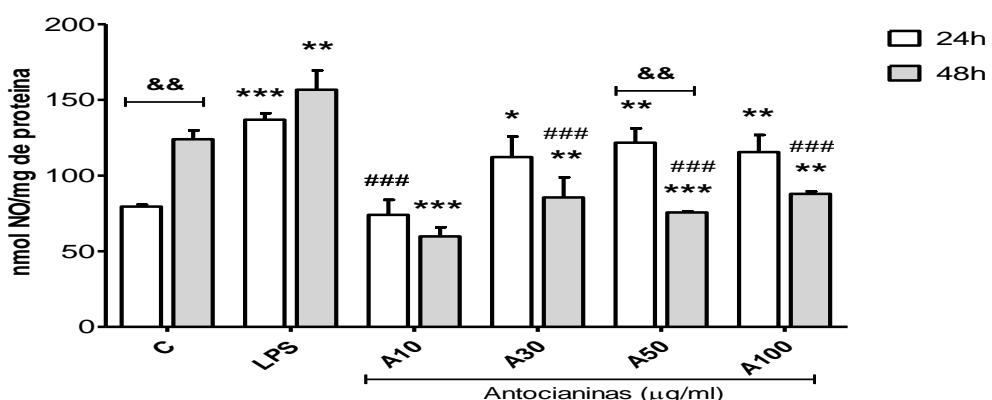


Figura 3. Análise da atividade da iNOS em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS e tratados com antocianinas..Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de post-hoc de Bonferroni. *, **, *** diferença significativa das células controle ($p < 0.05$, 0.01 e 0.001

respectivamente); *** diferença significativa do LPS ($p < 0.001$) e && diferença significativa entre os tempos.

O NO é um neurotransmissor que estaria envolvido na neuroinflamação, levando a morte celular (Figura 2) e em certas condições pode atuar como radical livre, sendo relacionado a várias doenças neurodegenerativas através do dano celular induzido por peroxinitrito. Nesse contexto, as antocianinas apresentaram reversão do aumento da atividade da iNos em modelo de neuroinflamação em astrócitos (Figura 3). As atividades protetoras da morte celular causada pelo insulto com LPS evidenciadas neste trabalho podem ocorrer através da modulação negativa da atividade da iNos.

4. CONCLUSÕES

As antocianinas não apresentaram toxicidade em astrócitos, demonstrando que o extrato possui baixo potencial para lesar células saudáveis do SNC, diminuindo a chance de efeitos adversos e indicando segurança. O extrato rico em antocianinas também demonstrou capacidade de reestabelecer a viabilidade de astrócitos que sofreram injúria inflamatória e também capacidade de reduzir a atividade de uma enzima produtora de óxido nítrico, um radical livre que em altas concentrações se torna lesivo para as células neuronais e gliais. Desta forma, as antocianinas são promissoras no tratamento de doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- GIUSTI, H., et al. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Food Science and Technology**. V. 1, p.163–187, 2009.
- CUNNINGHAM, C.; et al. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. **Biological Psychiatry**. V. 65, p. 304-312, 2009.
- KELSEY, N.; et al. Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. **Nutrition Neuroscience**. V.14, n.6, p 249 – 259, 2011.
- GOTTFRIED, C; et al. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). **Brain Research**. V. 833, n.2, p 142-149, 1999
- HUANG, W.C.; et al. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. **Immunology** V.128, p 275–286, 2009