

## PAPEL PROTETOR DO EXTRATO DE *RUBUS SP.* SOBRE ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM MODELO ANIMAL DE NEUROINFLAMAÇÃO

KARINA PEREIRA LUDUVICO<sup>1</sup>; VITOR CLASEN CHAVES<sup>2</sup>; LUIZA SPOHR<sup>1</sup>;  
MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>1</sup>; JESSIE MARTINS GUTIERRES<sup>1</sup>;  
FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – karina\_luduvico@outlook.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina – chavesvc@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaspohr@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – jessiegutierres@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é uma resposta protetora a injúrias celulares e teciduais. Este processo tem como finalidade remover o agente causador dos danos, beneficiando a reparação do tecido. Estudos demonstram que a produção excessiva de espécies reativas e de citocinas pró-inflamatórias está relacionada à neuroinflamação e a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (HSIEH e YANG, 2013). Sabe-se que o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina da parede celular de bactérias Gram-negativas, é capaz de induzir a neuroinflamação, sendo utilizado como indutor para o modelo animal (LAWSON et al., 2013; LEE et al., 2008; WICKENS et al., 2017).

O sistema colinérgico mediado pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh) está envolvido em uma ampla variedade de funções biológicas, como no processo de memória, aprendizagem e em outros aspectos cognitivos. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise de ACh em colina e ácido acético, uma reação necessária que permite ao neurônio colinérgico retornar ao seu estado de repouso após a ativação (COLOVIC et al., 2013; BRENNER et al., 2008).

Existem evidências que mostram a relação entre a neuroinflamação, doenças neurodegenerativas e a enzima AChE. De acordo com TYAGI e colaboradores (2008) a administração intracerebroventricular de LPS aumentou significativamente a atividade da AChE em córtex cerebral, estriado e hipocampo, indicando uma diminuição na sinalização colinérgica. Além disso, demonstrou-se que a AChE está associada com a deposição de placas beta-amilóide na Doença de Alzheimer e com o aumento da neurotoxicidade destas estruturas (INESTROSA et al., 2000; BRENNER et al., 2008).

Estudos na literatura têm abordado o potencial terapêutico dos nutracêuticos em patologias do sistema nervoso central, especialmente os compostos com capacidade antioxidante. Dentre estes compostos naturais, A amora preta (*Rubus sp.*) é um fruto pertencente à família *Rosaceae* do gênero *Rubus* (JACQUES e ZAMBIAZI, 2011), conhecido por demonstrar propriedades biológicas relevantes atribuídas aos altos níveis de compostos fenólicos (FERREIRA et al., 2010).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial efeito neuroprotetor do extrato metanólico de amora preta sobre a atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos submetidos ao modelo de neuroinflamação induzido pelo LPS.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 *Preparação do extrato de amora preta*

Os frutos foram coletados em área de cultivo pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Posteriormente, foram cortados em pequenos pedaços e submetidos à extração em banho de ultrassom. O líquido extrator utilizado foi metanol P.A na proporção de 1 grama de fruto fresco para 60 mL de solvente. Este processo foi repetido três vezes e os extratos foram reunidos no final. Após, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório para a eliminação do líquido extrator. Após, o extrato foi solubilizado em água pura e congelado a -20°C. Na sequência, o material foi submetido ao processo de liofilização para a completa secagem. A temperatura máxima de 35°C foi respeitada durante todo o procedimento. Este processo foi realizado em triplicata para todos os frutos utilizados no experimento.

### 2.2 *Protocolo experimental*

Foram utilizados camundongos Swiss machos, os quais foram divididos em quatro grupos experimentais: I (Salina); II (Extrato de amora 200 mg/Kg); III (LPS 250 µg/kg) e IV (Extrato de amora + LPS). Os animais foram fornecidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e tiveram livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEAA nº 3781/2017).

Os camundongos foram pré-tratados com extrato de amora ou veículo por via intragástrica (v.o) durante 15 dias. Após, receberam LPS (250 µg/Kg, i.p) ou veículo e, 24 h após, foram submetidos à eutanásia. O córtex cerebral, estriado e hipocampo dos animais foram retirados para análises bioquímicas posteriores.

### 2.3 *Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)*

A atividade da AChE foi determinada segundo o método de ELMANN et al. (1961), tendo como princípio a hidrólise do substrato acetilcolina a qual é convertida em dois produtos, acetato e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com o ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB) formando um cromóforo, reduzindo-o a 5-thio-2 nitrobenzoico (TNB), que possui uma coloração amarelada possível de ser quantificada em espectrofotômetro de luz UV. A atividade enzimática foi expressa em µmols de AcSch/h/mg de proteína. As proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando o reagente Comassie Blue. A albumina bovina foi utilizada como padrão.

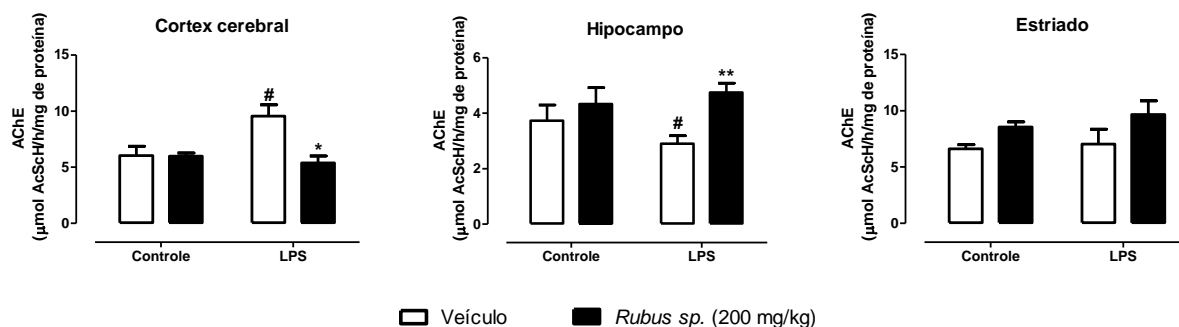
### 2.4 *Análises estatísticas*

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do teste post-hoc de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism 5 ®. Os resultados foram expressos como média ± erro médio padrão e considerados significativos para  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a atividade da AChE em córtex cerebral foi significativamente aumentada no grupo LPS ( $P < 0,05$ ). Entretanto, o pré-tratamento com extrato de *Rubus sp.* (200 mg/kg) foi capaz de prevenir o aumento da atividade da AChE induzido pelo LPS ( $P < 0,05$ ) (Figura 1). Diferentemente, em hipocampo houve uma redução significativa da atividade da AChE no grupo LPS, contudo o pre-tratamento com o extrato de amora foi capaz de prevenir esta redução ( $P < 0,05$ ). Com relação aos resultados obtidos em

estriado, nenhuma alteração foi observada na atividade enzimática da AChE ( $P > 0,05$ ) (Figura 1).



**Figura 1:** Efeito do pré-tratamento com extrato de *Rubus sp.* (200 mg/kg, p.o) sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos submetidos ao modelo de neuroinflamação induzido pela administração de lipopolissacarídeo (LPS). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão. # $P < 0,05$  diferente do grupo controle/veículo. \* $P < 0,05$  diferente do grupo LPS/veículo.

O aumento da atividade da AChE em córtex cerebral pode levar a uma diminuição dos níveis do neurotransmissor ACh, interrompendo desta forma a sinalização colinérgica, que por sua vez pode estar prejudicando as funções mediadas por este sistema. Embora diversos estudos demonstrem uma associação entre o aumento na atividade da AChE e a neuroinflamação, neste estudo observou-se que em hipocampo há uma redução da atividade desta enzima no grupo LPS. Corroborando com este resultado, LYKHMUS et al., (2016), demonstraram que a administração do LPS por via intraperitoneal é capaz de inibir a atividade da AChE em córtex pre-frontal e cerebelo de camundongos. Cabe salientar que o extrato de amora foi capaz de prevenir ambas as alterações encontradas na atividade da AChE, demonstrando o potencial efeito preventivo da amora frente a um ambiente pró-inflamatório. Neste contexto, produtos naturais podem desacelerar a progressão de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA), por exemplo, a qual está relacionada ao aumento da AChE.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível observar o papel protetor do extrato metanólico de amora preta frente as alterações da atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral e hipocampo de camundongos induzidas pelo LPS. Deste modo, o extrato pode ser considerado uma alternativa visando à prevenção de alterações presentes na neuroinflamação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315-335, 2013.

FERREIRA, D. S.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus spp.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 664-674, 2010.



- JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Phytochemicals in blackberry. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245-260, 2011.
- DING, M.; FENG, R.; WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; LU, Y.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; JIANG, B-H.; SHI, X. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. **Jour. of Biological Chem.**, v. 281, n. 25, p. 17359-17368, 2006.
- LAWSON, M. A.; MCCUSKER, R. H.; KELLEY, K. W. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 54, p. 1-12, 2013.
- LEE, J. W.; LEE, Y. K.; YUK, D. Y.; CHOI, D. Y.; BAN, S. B.; OH, K. W.; HONG, J. T. 2008. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 37, p. 1-14, 2008.
- WICKENS, R. A.; VER DONCK, L.; MACKENZIE, A. B.; BAILEY, S. J. Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. **Behavioural Brain Research**, 2017.
- TYAGI, E.; AGRAWAL, R.; NATH, C.; SHUKLA, R. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. **Journal of Neuroimmunology**, v. 205, p. 51-56, 2008.
- BRENNER, T.; NIZRI, E.; IRONY-TUR-SINAI, M.; HAMRA-AMITAY, Y.; WIRGUIN, I. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 201, p. 121-127, 2008.
- INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; GODOY, J., REYES, A.; DE FERRARI, G.V. Acetylcholinesterase-amyloid-beta-peptide interaction and Wnt signaling involvement in Abeta neurotoxicity. **Acta Neurol. Scand., Suppl.**, v. 176, p. 53-59, 2000.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- LYKHMUS, O.; MISHRA, N.; KOVAL, L.; KALASHNYK, O.; GERGALOVA, G.; USPENSKA, K.; KOMISARENKO, S.; SOREQ, H.; SKOK, M. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 19, p. 1-13, 2016.