

INOSINA PREVINE O AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS E DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS EXPOSTAS AO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

SARA KESKE¹; FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA²; NATHALIA STARK PEDRA³; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES⁴; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – saarakeske@gmail.com

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – fe.t@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nathaliastak@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoare@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação está relacionada com diversas patologias como por exemplo, a obesidade, doença de Alzheimer, no transtorno depressivo maior e diabetes mellitus do tipo 2 (LAINEZ e COSS, 2019; CALSOLARO e EDISON, 2016; KIM et al., 2016; KACIROVA et al., 2020). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas, quimiocinas e mensageiros secundários caracteriza a resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC), denominada neuroinflamação (DISABATO et al., 2016). Os astrócitos são células gliais que desempenham importantes funções associadas a fisiologia do SNC tais como na inflamação (WHEELER et al., 2019), permeabilidade da barreira hematoencefálica, e na gênese e manutenção de sinapses (CHRISTOPERSON et al., 2005; SANTELLO et al., 2009; SOFRONIEW, 2015). Entretanto, dependendo do estímulo, os astrócitos podem exacerbar as reações inflamatórias contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurológicas. Assim, terapias com foco nos astrócitos têm se tornado uma área de pesquisa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças que afetam o SNC.

Dentre as moléculas com ação anti-inflamatória pode-se destacar a inosina (JUNQUEIRA et al., 2017). A inosina é um metabólito proveniente da desaminação da adenosina em uma reação catalisada pela enzima adenosina desaminase. Dados da literatura já têm demonstrado que a inosina além de ter ação anti-inflamatória também tem ação antioxidante e protetora (MA, 2011; CHEN et al., 2002; GUO et al., 2021). Além disso, em relação aos astrócitos, Cipriane e colaboradores (2014) também demonstraram a capacidade protetora da inosina em um modelo de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em cultura astrocitária. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inosina em parâmetros de estresse oxidativo em cultura primária de astrócitos expostas ao LPS.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA 4808-2017). Para a cultura de astrócitos foi utilizado o córtex de ratos Wistar neonatos (1-2 dias) e as células foram mantidas em condições ideais de cultivo, conforme descrito por Gottfried e colaboradores (1999).

Neste estudo foi realizado um protocolo de prevenção com a inosina. Sendo assim, após 15 dias, nas condições descritas acima, as culturas primárias de astrócitos foram primeiramente expostas à inosina nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg/kg. Após 48 horas do tratamento com inosina, as células foram expostas ao lipopolissacarídeo (LPS) sob concentração de 1 µg/mL durante 3 horas. As células controle foram mantidas apenas em DMEM com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, realizou-se ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROS), de níveis de nitrito e de atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de ANOVA de uma via e em seguida por teste de post-hoc de Tukey. Assim, foram considerados valores significativos quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Figura 1, o LPS promoveu um aumento nos níveis de EROS e na atividade das enzimas SOD e CAT nas culturas primárias de astrócitos ($P < 0,05$). As concentrações de inosina de 25, 50 e 100 µg/kg foram capazes de prevenir o aumento de EROS induzido pelo LPS, enquanto que todas as concentrações de inosina testadas preveniram as alterações na atividade das enzimas antioxidantes ($P < 0,05$). Em relação aos níveis de nitrito, não foram observadas alterações em nenhum dos grupos avaliados no tempo de 48h.

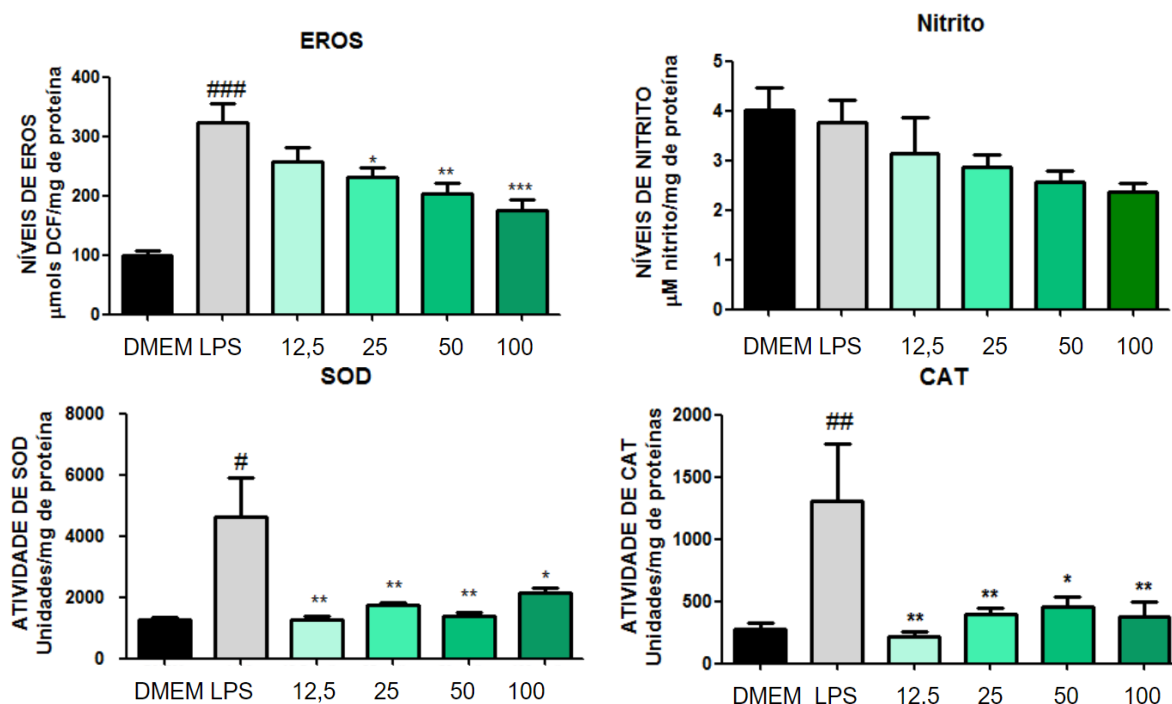


Figura 1 - Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), níveis de nitrito e atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e da enzima catalase (CAT) em cultura primária de astrócitos exposta a inosina e posteriormente ao LPS. A expressão dos dados é por média \pm erro padrão. Considera-se * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo LPS. # considera-se para $p < 0,05$, ## $P < 0,01$, comparado com o grupo controle.

Pelo fato dos astrócitos atuarem como moduladores da resposta imune SNC, a liberação exacerbada de espécies reativas por estas células pode contribuir para a neuroinflamação (BRAMBILLA, 2019), uma vez que a produção de radicais livres pode ativar vias pró-inflamatórias, como a do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (LINGAPPAN, 2018). Em condições de neuroinflamação o fator de transcrição Nrf2 é ativado e garante que enzimas antioxidantes sejam transcritas (CHEN et al., 2020). Contudo, foi demonstrado que em células, modificadas geneticamente para ausência do gene codificante para Nrf2, houve ativação maior da via de NF- κ B e maior liberação de fatores pró-inflamatórios (PAN et al., 2011). Dentre as enzimas, nas quais a Nrf2 regula a transcrição estão CAT e SOD (ZHU et al., 2005). Estas enzimas promovem reações de neutralização das espécies reativas.

Em relação a inosina os dados deste trabalho corroboram com outros dados da literatura que também relataram a ação deste nucleosídeo em modular o status redox em cérebro de ratos (RUHAL e DHINGRA, 2018). Um possível mecanismo envolvido neste efeito da inosina pode estar associado ao aumento do urato, o qual tem sido descrito como uma importante defesa antioxidante endógena contra danos oxidativos e nitrosativos.

4. CONCLUSÕES

A inosina foi capaz de prevenir as alterações no status redox induzido pelo LPS em cultura primária de astrócitos sugerindo que esta molécula possui uma ação promissora para o tratamento de doenças neurológicas associadas com neuroinflamação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAMBILLA, R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathology**. v.137, n.5, p.757-783, 2019.
- CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimers Dementia**. v.12, n.6, p.719-732, 2016.
- CHEN, P.; GOLDBERG, D.E.; KOLB, B.; LANSER, M.; BENOWITZ, L.I. Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.9, n.13, p. 9031-9036, 2002.
- CHEN, Y.; QIN, C.; HUANG, J.; TANG, X.; LIU, C.; HUANG, K.; XU, J.; GUO, G.; TONG, A.; ZHOU, L. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. **Cell Proliferation**. v.53, n.3, p. 1-13, 2020.
- CHISTOPHERSON, K.S.; ULLIAN, E.M.; STOKES, C.C.; MULLOWNWY, C.E.; HELL, J.W.; AGAH, A.; LAWLER, J.; MOSHER, D.F.; BORNSTEIN, P.; BARRES, B.A. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**. v.120, n.3, p.421-433, 2005.
- CIPRIANI, S.; BAKSHI, R.; SCHWARZSCHILD, M.A. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. v.274, p.242-249, 2014.
- DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**. v.139, n.2, p.136–153, 2016.
- GUO, W.; XIANG, Q.; MAO, B.; TANG, X.; CUI, S.; LI, X.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Protective Effects of Microbiome-Derived Inosine on Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Damage and Inflammation in Mice via Mediating the

- TLR4/NF- κ B Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 69, n.27, p.7619-7628, 2021.
- GOTTFRIED, C.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C.; KARL, J.; WOFCHUK, S.T.; RODNIGHT, R. 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.
- JUNQUEIRA, S.C.; DOS SANTOS, I.C.; LIEBERKNECHT, V.; CUNHA, M.P.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S.; SANTOS, A.R.S.; DUTRA, R.C.; Inosine, an Endogenous Purine Nucleoside, Suppresses Immune Responses and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Role for A2A Adenosine Receptor. **Molecular Neurobiology**. v.54, n. 5, p. 3271-3285, 2017.
- KACÍŘOVÁ, M.; ZMEŠKALOVÁ, A.; KOŘÍNKOVÁ, L.; ŽELEZNÁ, B.; KUNEŠ, J.; MALETÍNSKÁ, L. Inflammation: major denominator of obesity, Type 2 diabetes and Alzheimer's disease-like pathology? **Clinical Science (London)**. v.134, n.5, p. 547-570. 2020.
- KIM, Y.K.; NA, K.S.; MYINT, A.M.; LEONARD, B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.64, p.277-2784, 2016.
- LINGAPPAN, K. NF- κ B in Oxidative Stress. **Current Opinion in Toxicology**. v.7, p.81-86, 2018.
- PAN, H.; WANG, H.; ZHU, L.; MAO, L.; QIAO, L.; SU, X. Depletion of Nrf2 enhances inflammation induced by oxyhemoglobin in cultured mice astrocytes. **Neurochemistry Research**. v.36, n.12, p.2434-2441, 2011.
- LINNERBAUER, M.; WHEELER, M.A.; QUINTANA, F.J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. **Neuron**. v. 108 n.4, p.608-622, 2021.
- LAINEZ N.M.; CROSS, D. Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. **Endocrinology**. v.160, n.11, p.2719-2736. 2019.
- MA, Q.R.; YANG, H.; ZHAO, X.H.; ZHANG, Y.K.; YAO, A.H., CHENG, P.; XIE, Y.B.; ZHAO, H.K.; JU, G.; KUANG, F. The protective effects of inosine against chemical hypoxia on cultured rat oligodendrocytes. **Cell Molecular Neurobiology**. v.31, n.8, p.1171-1186, 2011.
- SANTELLO, M; VOLTERRE, A. Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release. **Neuroscience**. v.158, n.1, p.253-259, 2009.
- SOFRONIEW, M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neurosciences**. v.16, n.5, p.249-263, 2015.
- WHEELER, M.A.; JARONEN, M.; COVACU, R.; ZANDEE, S.E.J.; SCALISI, G.; ROTHHAMMER, V.; TJON, E.C.; CHAO, C.C.; KENISON, J.E.; BLAIN, M., RAO, V.T.S.; HEWSON, P.; BARROSO, A.; GUTIÉRREZ-CÀZQUEZ, C.; PRAT, A.; ANTEL, J.P.; HAUSER, R.; QUINTANA, F.J. Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation. **Cell**. v.176, n.3, p.581-596, 2019.
- ZHU, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; ZWEIER, J.L.; LI, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. **FEBS Letters**. v.579, n.14, p. 3029- 3036. 2005.