

## EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO GÁLICO FRENTE À NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CÓRTEX CEREBRAL DE CAMUNDONGOS

THAIS MARINI DA ROSA<sup>1</sup>; VÂNIA MACHADO RECARTE<sup>2</sup>; ANITA AVILA DE  
SOUZA<sup>3</sup>; KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE<sup>4</sup>; MAYARA SANDRIELLY  
SOARES DE AGUIAR<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - thr.marini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – varecar@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas- anita\_a\_avila@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas- kelenqf@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoes@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é uma resposta complexa à lesão cerebral e caracteriza-se pela ativação das células gliais como astrócitos e micróglia, além da produção e liberação de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Esse processo ocorre em eventos que incluem a progressão e exacerbação de distúrbios neurodegenerativos, neuropsiquiátricos e metabólicos (DISABATO, et al. 2016).

Durante a neuroinflamação diversos sistemas encontram-se alterados como a sinalização colinérgica e atividades das ATPases. A sinalização colinérgica é mediada pela acetilcolina, um importante neurotransmissor que também tem demonstrado uma ação anti-inflamatória. No entanto, a sinalização colinérgica pode ser interrompida pela atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pela degradação da acetilcolina e que geralmente encontra-se aumentada na neuroinflamação. Assim, compostos com capacidade de inibir a atividade da AChE poderiam conferir neuroproteção e modulação da resposta inflamatória (BEFANTE, et al. 2019).

Por outro lado, as enzimas Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase e Ca<sup>2+</sup> ATPase desempenham um papel crucial no sistema nervoso central (SNC), uma vez que são responsáveis pela manutenção do gradiente iônico e pela propagação do impulso nervoso. Além disso, a inibição dessas enzimas tem sido associada a doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e transtornos de humor (OHNISHI, et al. 2015). Dessa forma, os eventos encontrados no processo de neuroinflamação podem levar a neurotoxicidade e morte celular no SNC, sendo assim, importantes alvos de estudos para novas alternativas terapêuticas frente à neuroinflamação.

Nesse sentido, o ácido gálico (AG), é um composto fenólico encontrado de forma natural em plantas, vegetais, nozes e frutas que possui excelentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de efeitos antitumorais e neuroprotetores (BAI J, et al. 2021). Portanto, o AG torna-se um importante alvo de estudo contra a neuroinflamação. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do AG sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , e na atividade das enzimas AChE, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase e Ca<sup>2+</sup> ATPase em córtex cerebral de camundongos submetidos a um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeos (LPS).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Animais e protocolo experimental

Camundongos machos Swiss foram divididos em quatro grupos (n=6 por grupo): I - controle, II-LPS (250 µg/kg), III-LPS + AG (50 mg/kg) e IV- LPS + AG (100 mg/kg). Os animais receberam por via oral veículo ou AG por 14 dias. Entre o 8º e 14º dia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de LPS ou água para injetáveis. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia e o córtex cerebral foi coletado para posteriores análises. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPel (CEEAA 17187-2020).

### 2.2 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α)

A dosagem do TNF-α em córtex cerebral foi realizada com kit comercial pela técnica de ELISA. A concentração de TNF-α foi determinada de acordo com as instruções do fabricante e foi expressa como pg por mg de proteína.

### 2.3 Análise das enzimas AChE, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase e Ca<sup>2+</sup> ATPase

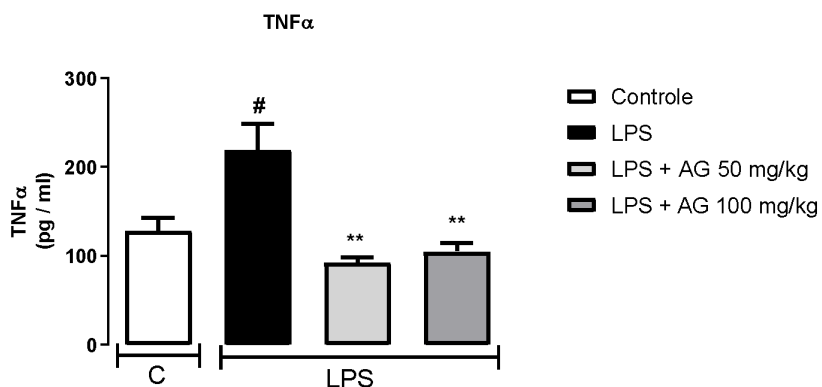
A atividade da AChE foi determinada conforme previamente descrito (ELLMAN et al. 1961) e expressa em µmol AcSCh/hora/mg de proteína. A atividade das enzimas Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>- ATPase e Ca<sup>2+</sup>- ATPase foi determinada de acordo com o método de Stefanello et al. (2007) e Teixeira et al. (2020) e expressas em nmol Pi liberado por min por mg de proteína.

### 2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Os dados foram expressos como média ± erro padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

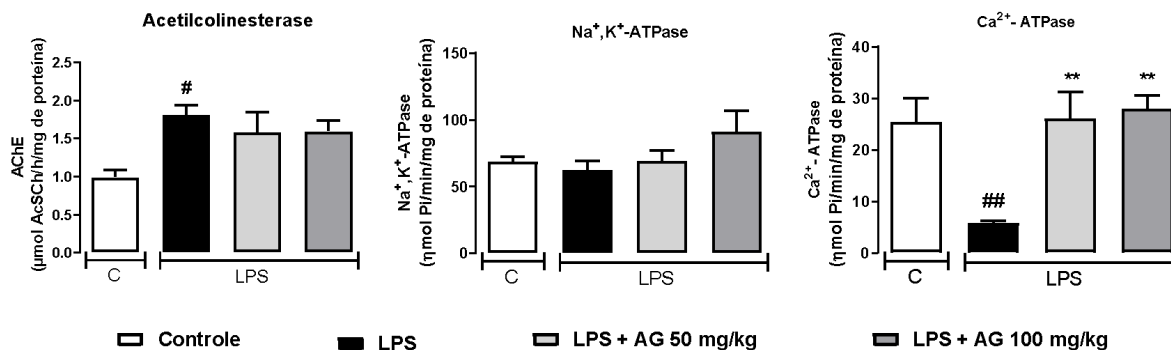
Como demonstrado na figura 1, é possível observar que a administração do LPS foi capaz de induzir um aumento nos níveis de TNF-α em córtex cerebral ( $P < 0,01$ ). No entanto, ambas as concentrações de AG testadas foram capazes de proteger contra esse aumento nos níveis de TNF-α ( $P < 0,01$ ).



**Figura 1:** Efeito do tratamento com ácido gálico (AG) (50 e 100 mg/kg) sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNFα) em córtex cerebral de camundongos submetidos a um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (250 µg/kg). #  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle e \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo LPS.

Na figura 2 é possível observar que a administração do LPS foi capaz de aumentar a atividade da AChE ( $P < 0,05$ ) em córtex cerebral, no entanto o tratamento com AG não foi capaz de prevenir esta alteração ( $P > 0,05$ ). Por outro

lado, ambas as doses de AG foram capazes de proteger ( $P < 0.01$ ) contra a redução da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em córtex cerebral induzida pelo LPS ( $P < 0.01$ ). Nenhuma alteração significativa foi encontrada em relação a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPase ( $P > 0.05$ ).



**Figura 2:** Efeito do tratamento com ácido gálico (AG) (50 e 100 mg/kg) sobre atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE),  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase em córtex cerebral de camundongos submetidos a um modelo de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (250 μg/kg). <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$  comparado com o grupo controle e <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  comparado ao grupo LPS.

Dessa maneira, como encontrado no presente trabalho, diversos estudos têm relatado que a injeção periférica de LPS é capaz de mediar a neuroinflamação, aumentando a expressão e o conteúdo de  $\text{TNF-}\alpha$  no SNC (CATORCE, et al. 2016). Todavia, o AG foi capaz de evitar esse aumento, assim como alguns estudos têm sugerido que a ação anti-inflamatória associada ao AG deve-se a supressão da atividade do fator de transcrição NF $\kappa$ B ativado por TNF (MIRSHEKAR, et al. 2018).

Ademais, observou-se que a administração de LPS induz aumento da atividade da AChE assim como encontrado em doenças neurodegenerativas, tanto em pacientes quanto em modelos animais pré-clínicos. Além disso, essa condição pode levar a uma redução nos níveis de acetilcolina prejudicando seus efeitos moduladores na memória, cognição e plasticidade neuronal. Também é bem conhecido que a redução dos níveis de acetilcolina pode contribuir para a neuroinflamação mediada por TNF (MAURER, et al. 2017; KHAN et al., 2018).

Por fim, a inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pelo LPS sugere que a presença de desregulação da homeostase do cálcio poderia prejudicar diferentes vias de sinalização dependentes desse íon. Dessa forma, a ação do AG em restabelecer a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase está contribuindo para o efeito neuroprotetor desse polifenol.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, o AG protege o córtex cerebral das alterações neuroinflamatórias induzidas pelo LPS. Ainda, é importante salientar que o AG apresenta efeitos multialvos reduzindo tanto mediadores inflamatórios clássicos como  $\text{TNF-}\alpha$ , assim como restabelecendo a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Em conjunto, esses dados suportam novos estudos para investigar os efeitos neuroprotetores do AG em modelos de doenças neurodegenerativas que cursam com a neuroinflamação em sua fisiopatologia.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DISABATO, DJ; QUAN N; GODBOUT J. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem**. Columbus, v.139, n. 2, p.136-153, 2016.

BENFANTE R, DI LASCIO S, CARDINI S, FORNASARI D. Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: a new therapeutic perspective in aging-related disorders. **Aging Clinical and Experimental Research**. Switzerland, v. 33, n. 4, p. 823-834, 2019.

Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H. Na, K-ATPase  $\alpha 3$  is a death target of Alzheimer patient amyloid- $\beta$  assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. California, v. 112, n. 32, p. 4465-4474, 2015.

BAI J, ZHANG Y, TANG C, HOU Y, AI X, CHEN X, ZHANG Y, WANG X, MENG X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. China, v. 133, p. 1-14, 2021.

MIRSHEKAR MA, SARKAKI A, FARBOOD Y, GHARIB NASERI MK, BADAVI M, MANSOURI MT, HAGHPARAST A. Neuroprotective effects of gallic acid in a rat model of traumatic brain injury: behavioral, electrophysiological, and molecular studies. **Iran J Basic Med Sci**. Iran, v. 21, n. 10, p. 1056-1063, 2018.

MAURER SV, WILLIAMS CL. The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with nonneuronal cells. **Front Immunol**. United States, v. 8, p. 1-9, 2017.

KHAN H, MARYA AS, KAMAL MA, PATEL S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. **Biomed Pharmacother**. Pakistan, v. 101, p. 860-870, 2018.

ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V Jr, FEATHER-STONE RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. USA, v. 7, p. 88-90, 1961.

STEFANELLO, F. M. SCHERER, E. B. S.; KUREK, A. G.; MATTOS, C. B.; WYSE, A. T. S. Effect of hypermethioninemia on some parameters on oxidative stress and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats. **Metabolic Brain Disease**. v. 22, n. 2, p. 172-182, 2007.

TEIXEIRA FC, GUTIERREZ JM, SOARES MSP, DA SIVEIRA DE MATTOS B, SPOHR L, DO COUTO CAT, BONA NP, ASSMANN CE, MORSCH VM, DA CRUZ IBM, STEFANELLO FM, SPANEVELLO RM. Inosine protects against impairment of memory induced by experimental model of Alzheimer disease: a nucleoside with multitarget brain actions. **Psychopharmacology**. Pelotas. v. 237, n. 3, p. 811-823, 2020.

CATORCE MN, GEVORKIAN G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. **Current Neuropharmacology**. México. v. 14, n. 2, p. 155-164, 2016.