

ÁCIDO ELÁGICO PREVINE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

THAIS MARINI DA ROSA¹; NATHALIA STARK PEDRA²; LARISSA MENEZES DA SILVEIRA³; JULIANE TORCHELSEN SARAIVA⁴ JÚLIA ARAÚJO DA SILVA⁵
ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – thr.marini@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – larissamenezes1999@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – juliaaraujodasilva@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta imune para proteger o organismo contra patógenos, lesões ou toxinas. Assim, o termo neuroinflamação refere-se a inflamação no sistema nervoso central (SNC) (HENEKA et al., 2015). Esse processo é caracterizado pela ativação de células gliais, em especial, os astrócitos, que liberam mediadores inflamatórios como citocinas e produzem espécies reativas (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Quando ocorre de forma excessiva ou persistente, a neuroinflamação causa danos teciduais e morte celular levando ao desenvolvimento e a progressão de doenças neurológicas (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016).

O estresse oxidativo (EOX) é causado pelo aumento nos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e está presente em doenças neurodegenerativas (NGO; DUENNWALD, 2022). Esta produção excessiva de espécies reativas danifica macromoléculas, além de causar disfunções e morte celular (MAZUMDER; CHOUDHURY; BORAH, 2019). As doenças neurodegenerativas possuem um grande impacto na cotidiano dos pacientes, causando perdas na qualidade de vida. Assim, a busca por novos agentes terapêuticos que possam prevenir o dano oxidativo cerebral torna-se imprescindível. Sendo assim, o ácido elágico (AE) surge como uma alternativa terapêutica devido às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (ZHU et al., 2022).

O ácido elágico (AE) é um polifenol presente em frutas e vegetais, tais como, romã, morango, framboesa e nozes. O AE possui uma porção hidrofílica com quatro grupos hidroxila e duas lactonas juntamente com uma porção lipofílica com dois anéis de hidrocarbonetos (PUBCHEM, 2022). Estudos prévios da literatura demonstram que o AE é capaz de eliminar agentes pró-oxidantes e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase e glutatona redutase (PUBCHEM, 2022; ZUCCARI et al., 2020). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do AE no status redox em cultura primária de astrócitos expostas ao lipopolissacarídeo (LPS).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos *Wistar* neonatos (1 a 2 dias) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Os animais foram eutanasiados e o córtex cerebral foi separado e dissociado mecanicamente. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera umidificada 5% de CO₂, por 15 dias ou até atingir a confluência de maturação e diferenciação celular.

Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição com protocolo número 027159/2022-43.

Os astrócitos foram semeados em placas de 6 e 96 poços e a troca de meio foi realizada a cada quatro dias. O AE foi dissolvido em dimetilsulfóxido, afim de obter as concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL. Para analisar o potencial neuroprotetor do AE, a neuroinflamação foi induzida pelo LPS conforme descrito por Alvez e colaboradores (2022). As células foram primeiro expostas a LPS (1 µg/mL) durante 3 h e, posteriormente, tratadas com AE durante 48 h. As células do controle foram mantidas apenas em DMEM com 10% de SFB.

Quanto aos parâmetros oxidativos, foram determinados os níveis de ERO (ALI; LEBEL; BONDY, 1992), nitritos (STUEHR; NATHAN, 1989), conteúdo tiólico total (SH) (AKSENOV; MARKESBERY, 2001) e a atividade das enzimas SOD (MISRA; FRIDOVICH, 1972); CAT (AEBI, 1984) e da glutathione S-transferase (GST) (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o AE foi capaz de proteger contra os danos oxidativos induzidos pelo LPS em astrócitos (Figura 1). Quando os astrócitos foram expostos ao LPS houve um aumento significativo na produção de ERO e nitritos em comparação às células controle, após 48 h de tratamento. No entanto, quando tratados com AE, os resultados das ERO e nitritos diminuíram significativamente nas duas concentrações mais altas quando comparados ao grupo LPS (100 e 200 µg/mL) (Figura 1A e B). Além disso, a exposição ao LPS diminuiu os níveis de SH e o tratamento com AE foi capaz de prevenir esta alteração nas duas maiores concentrações testadas (Figura 1C).

Por outro lado, o LPS reduziu a atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST, em comparação aos astrócitos do grupo controle (Figura 2). Entretanto, o tratamento com AE preveniu tais alterações. Nesse sentido, um aumento significativo na atividade da SOD e CAT foi observado nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, enquanto o aumento na atividade da GST foi observado em todas as concentrações do testadas de AE.

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição dos astrócitos ao LPS é capaz de induzir o EOX mediante o aumento dos níveis de espécies reativas, corroborando assim com os achados deste trabalho (PACHECO et al., 2017, FACHEL et al., 2020, ALVEZ et al., 2023). Conforme Zhu e colaboradores (2022), a inibição da atividade das enzimas SOD, CAT e GST causada pelo LPS eleva os níveis celulares de ERO e nitritos.

Em contrapartida, o AE promoveu uma redução das espécies reativas no cultivo primário de astrócitos por meio de sua ação antioxidante que ocorre devido à sua propriedade direta de eliminação de radicais livres, o qual pode ser evidenciado através do aumento significativo nos níveis de SH e da atividade das enzimas antioxidantes em astrócitos expostos ao AE, em comparação ao tratamento com LPS. De fato, estudos destacam o potencial do AE em aumentar significativamente a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em modelos experimentais de neuroinflamação (DORNELLES et al., 2020).

De acordo com Tiwari e Mishra (2013), esse efeito pode ser atribuído à presença do grupo hidroxila e do anel lactona na estrutura do AE, os quais desempenham importante papel na eliminação direta de ânion superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e de peroxinitrito, consequentemente, diminuindo o EOX (TIWARI; MISHRA 2013). Portanto, pode-se relacionar os efeitos protetores do

AE às suas propriedades antioxidantes, como evidenciado pelo aumento do sistema antioxidante e consequente redução na geração de espécies reativas.

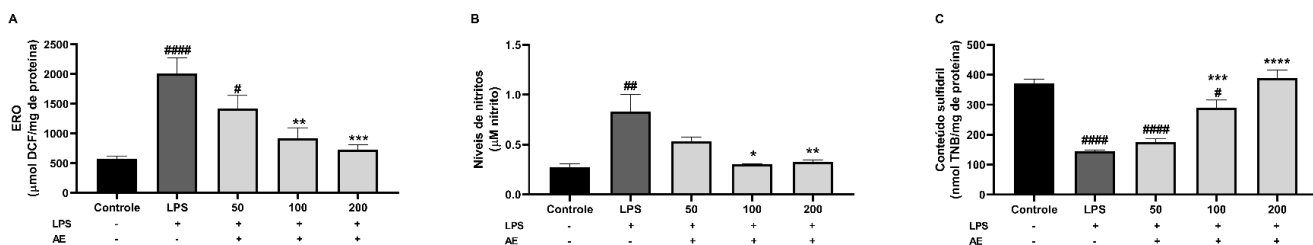


Figura 1. Espécies reativas de oxigênio (ERO) (A), nitritos (B) e conteúdo tiólico total (SH) (C) em cultura primária de astrócitos exposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e ácido elágico (AE) no protocolo de prevenção. Os valores representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste de post hoc de Tukey. *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001 diferente do grupo LPS. #P<0,05; ## P<0,01; #### P<0,01 diferente das células controle.

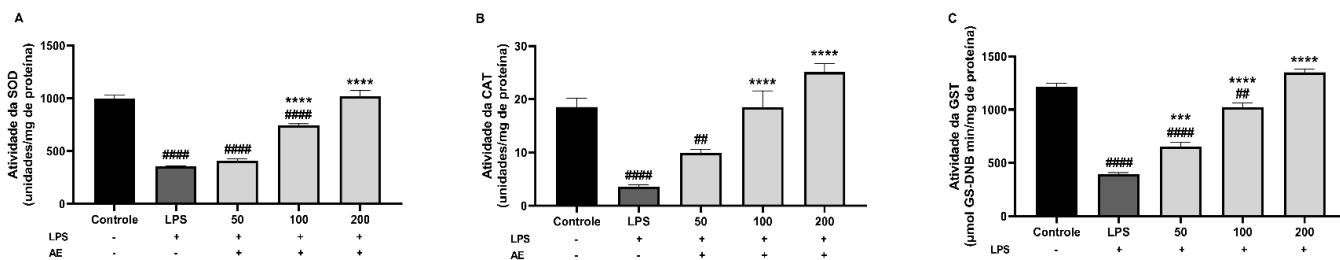


Figura 2. Atividades da superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutatona S-transferase (GST) (C) em cultura primária de astrócitos exposta a lipopolissacarídeo (LPS) e ácido elágico (AE) no protocolo de prevenção. Os valores representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. ***P < 0,001, ****P < 0,0001, diferente do grupo LPS. ##P < 0,01 e #####P < 0,0001, diferente das células de controle.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o AE preveniu as alterações oxidativas no cultivo primário de astrócitos induzidas pelo LPS, mediante a diminuição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e aumento das defesas antioxidantes. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos glioprotetores do AE na neuroinflamação e na resposta astrocitária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, 1984. p. 121-126.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 637-648, 1992.
- AKSENOV, M.; MARKESBERY, W. Changes in thiol content and expression of

glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.

ALVEZ, F. et al. Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 283-297, 2023.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136-153, 2016.

DJEDJIBEGOVIC, J. et al. Ellagic acid-derived urolithins as modulators of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.

DORNELLES, G.; et al. Ellagic acid inhibits neuroinflammation and cognitive impairment induced by lipopolysaccharides. **Neurochemical Research**, v. 45, p. 2456-2473, 2020.

FACHEL, F. et al. Glioprotective effect of chitosan-coated rosmarinic acid nanoemulsions against lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in rat astrocyte primary cultures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, p. 123-139, 2020.

HABIG, W.; PABST, M.; JAKOBY, W. Glutathione S- transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HENEKA, M. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

MAZUMDER, M.; CHOUDHURY, S.; BORAH, A. An in silico investigation on the inhibitory potential of the constituents of Pomegranate juice on antioxidant defense mechanism: Relevance to neurodegenerative diseases. **IBRO Reports**, v. 6, p. 153-159, 2019.

MISHRA, S.; VINAYAK, M. Ellagic acid inhibits PKC signaling by improving antioxidant defense system in murine T cell lymphoma. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 4187-4197, 2014.

MISRA, H.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

NGO, V.; DUENNWALD, M. L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2345, 2022.

PACHECO, S. et al. Glioprotective effects of lingonberry extract against altered cellular viability, acetylcholinesterase activity, and oxidative stress in lipopolysaccharide-treated astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, p. 1107-1121, 2018.

TIWARI, M.; MISHRA, P. Modeling the scavenging activity of ellagic acid and its methyl derivatives towards hydroxyl, methoxy, and nitrogen dioxide radicals. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, p. 5445-5456, 2013.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiological reviews**, v. 98, n. 1, p. 239-389, 2018.

ZHU, H. et al. Ellagic acid and its anti-aging effects on central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10937, 2022.

ZUCCARI, G. et al. Formulation strategies to improve oral bioavailability of ellagic acid. **Applied Sciences**, v. 10, n. 10, p. 3353, 2020.