

EFEITO DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Ilex paraguariensis* SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ASTRÓCITOS TRATADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO

VANIZE MACKEDANZ LÜDTKE¹; NATHALIA STARK PEDRA²; JULIANE TORCHELSEN SARAIVA³; FRANCIELI DA SILVA DOS SANTOS⁴; GIULIA BUENO DE OLIVEIRA DA SILVA⁵; FRANCIELI MORO STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vanizemackedanz@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – nathaliastark@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – julianetorchelsen@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – tessmerfran@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – giuliadasilvas2002@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida nas últimas décadas houve um crescimento na incidência de distúrbios neurodegenerativos. Estima-se que o número de pessoas que sofrem dessas condições em todo o mundo provavelmente triplicará até 2050 (DECANDIA *et al.*, 2023). Embora os mecanismos patogênicos das doenças neurodegenerativas sejam diversos e complexos, a neuroinflamação é uma característica comum (GIRI *et al.*, 2024).

A neuroinflamação é uma resposta inflamatória originada no sistema nervoso central (SNC) após uma injúria e que leva a uma ativação de células da glia, como os astrócitos. A ativação persistente ou desregulada de astrócitos é marcada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento do estresse oxidativo (KWON; KOH, 2020). Considerando o papel que os astrócitos desempenham na manutenção da homeostase do SNC, a pesquisa novos agentes farmacológicos, direcionadas estas células gliais, é de grande relevância na prevenção da neuroinflamação.

Neste contexto, produtos naturais têm sido estudados como fonte de compostos bioativos com ações neuroprotetoras (WANG *et al.*, 2018). *Ilex paraguariensis* (erva-mate) é uma planta da família Aquifoliaceae que possui grande importância econômica e cultural na América do Sul. Um grande número de metabólitos secundários foram identificados na erva-mate como compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas; e à eles são atribuídas diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória e antioxidante (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Embora alguns estudos tenham demonstrado atividade neuroprotetora, os mecanismos responsáveis por esse efeito não são totalmente compreendidos.

Assim, este trabalho pretende investigar os efeitos do tratamento com extrato padronizado de *I. paraguariensis* (EIP) em cultivo primário de astrócitos utilizando um modelo experimental de neuroinflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros de estresse oxidativo.

2. METODOLOGIA

O EIP foi preparado pelo método de infusão aquosa e previamente caracterizado conforme descrito por FARIAS *et al.* (2021).

Para o cultivo primário de astrócitos, ratos neonatos (1-3 dias) foram eutanasiados para a obtenção do córtex cerebral. As estruturas foram

homogeneizadas, centrifugadas, e o pellet resultante suspenso em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os astrócitos foram semeados em placas de 96 poços (3×10^4 células por poço) e de 6 poços (3×10^5 por poço) e mantidas sob condições padrão de cultivo celular (5% de CO_2 , 37 °C e atmosfera umidificada) (GOTTFRIED *et al.*, 1999). Após a maturação celular, as células foram tratadas com o EIP nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Posteriormente, foram expostas ao LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 3 horas. As células mantidas apenas em DMEM com 10% de SFB foram consideradas como controle.

A determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi determinada segundo ALI *et al.* (1992). A quantificação dos nitritos foi realizada de acordo com STUEHR; NATHAN (1989). O conteúdo tiólico total (SH) foi determinado segundo AKSENOV; MARKESBERY (2001). A atividade da catalase (CAT) foi verificada conforme descrito por AEBI (1984). Os dados foram analisados utilizando a ANOVA de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 1** mostra o efeito do tratamento com EIP sobre parâmetros de estresse oxidativo em astrócitos expostos ao LPS. Nossos resultados indicaram um aumento significativo nos níveis de ERO ($P < 0,0001$) e nitritos ($P < 0,01$) e uma diminuição no conteúdo de SH ($P < 0,05$) e na atividade da CAT ($P < 0,05$) em astrócitos após 3h de exposição ao LPS em comparação ao grupo controle. Nossos achados estão de acordo com PACHECO *et al.* (2018), sendo sugerido que os efeitos causados pelo LPS possam ter sido mediados pela ativação dos receptores TLR4 presentes em astrócitos (GORINA *et al.*, 2011).

O tratamento com EIP foi capaz de prevenir o aumento de ERO por LPS em todas as concentrações testadas, 10 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$), 30 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,0001$), 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,0001$) e 300 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,0001$) em comparação ao grupo LPS (**Figura 1A**). Em relação aos níveis de nitritos, o EIP preveniu o aumento induzido por LPS nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,01$, **Figura 1B**). Além disso, o pré-tratamento por 24h com EIP aumentou significativamente os níveis de SH na concentração de 30 ($P < 0,001$), 100 ($P < 0,0001$) e 300 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,0001$) em comparação com o grupo exposto ao LPS (**Figura 1C**). E ainda, foi capaz de prevenir a redução na atividade da CAT em todas as concentrações testadas ($P < 0,01$ para 10 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0,001$ para 30 $\mu\text{g/mL}$ e $P < 0,0001$ para 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 1D**).

A capacidade antioxidante de *I. paraguariensis* está bem estabelecida, o que tem sido associado ao alto conteúdo em compostos fenólicos (GAWRON-GZELLA; CHANAJ-KACZMAREK; CIELECKA-PIONTEK, 2021). Os ácidos fenólicos, como os ácidos clorogênicos, apresentam propriedades antioxidantes agindo como quelantes de metais e sequestrantes de espécies reativas como radicais hidroxila e ânions superóxido e peroxinitritos (BECKER *et al.*, 2019). Deste modo, a diminuição do estresse oxidativo em astrócitos expostos ao LPS pré-tratados com erva-mate podem ser atribuídos, em parte, a capacidade antioxidante direta de metabólitos presentes, como os compostos fenólicos.

Além disso, tem sido postulado que os compostos fenólicos poderiam promover o desprendimento da proteína repressora citosólica, proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch, permitindo a translocação nuclear de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2). Uma vez no núcleo, o NRF2 se liga a sequências regulatórias, promovendo a transcrição de genes citoprotetores que desempenham

funções essenciais na defesa celular contra o estresse oxidativo como a síntese de enzimas antioxidantes (CARDOZO *et al.*, 2013). Assim, pode-se sugerir que a ativação da via NRF2 em astrócitos possa estar envolvida no mecanismo antioxidante de *I. paraguariensis* observado neste estudo.

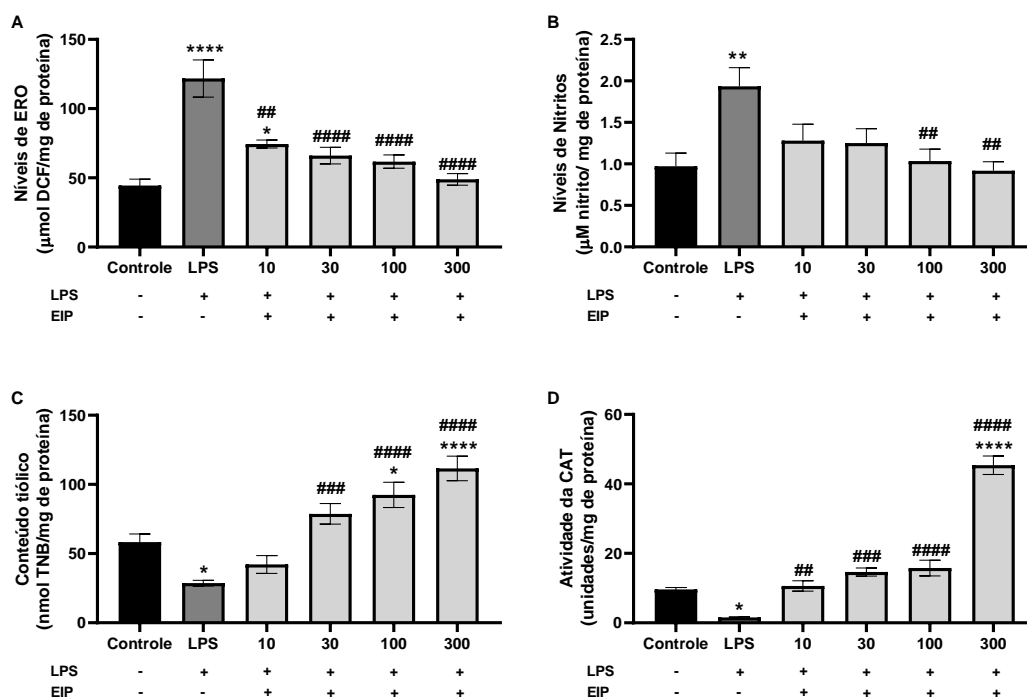


Figura 1. Efeito do tratamento de EIP sobre ERO (A), nitritos (B), conteúdo tiólico total (C) e CAT (D) em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS. Dados expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes (n=5-6), analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

*P<0,05, **P<0,01 e ****P<0,0001 comparado ao grupo controle. ##P<0,01, ###P<0,001 e ####P<0,0001 comparado ao grupo LPS.

4. CONCLUSÕES

Estes resultados fornecem a primeira demonstração de que a *I. paraguariensis* apresenta um efeito neuroprotetor, por meio de um mecanismo antioxidante, contra o dano astrocítico induzido por LPS, evidenciando o potencial papel do EIP contra doenças relacionadas à neuroinflamação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, p.141-145, 2001.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v.13, p.637-648, 1992.

BECKER, A.M. *et al.* Spray-dried Yerba Mate extract capsules: clinical evaluation and antioxidant potential in healthy individuals. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.74, p.495-500, 2019.

CARDOZO, L.F. *et al.* Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**, v.95, p.1525-1533, 2013.

DECANDIA, D. *et al.* Dietary protection against cognitive impairment, neuroinflammation and oxidative stress in Alzheimer's disease animal models of lipopolysaccharide induced inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, p.5921, 2023.

FARIAS, I.V. *et al.* In vitro free radical scavenging properties and anti-inflammatory activity of *Ilex paraguariensis* (Maté) and the ability of its major chemical markers to inhibit the production of proinflammatory mediators. **Mediators of Inflammation**, v.2021, p.7688153, 2021.

GAWRON-GZELLA, A.; CHANAJ-KACZMAREK, J.; CIELECKA-PIONTEK, J. Yerba Mate - A Long but Current History. **Nutrients**, v.13:3706, p.1-19, 2021.

GIRI, P.M. *et al.* Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: current knowledge and therapeutic implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v.25, p.3995, 2024.

GORINA, R. *et al.* Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, v.59, p.242-255, 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, p.142-149, 1999.

KWON, H. S.; KOH, SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v.9, p.42, 2020.

PACHECO, S.M. *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

STUEHR, D.; NATHAN, C. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.1543-1555, 1989.

WANG, J. *et al.* Connection between systemic inflammation and neuroinflammation underlies neuroprotective mechanism of several phytochemicals in neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018:1972714, 2018.