

EFEITOS DO ÁCIDO ELÁGICO EM ENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE RATOS EXPOSTOS AO LIPOPOLISSACARÍDEO

ALESSANDRA DOS SANTOS¹; ANITA AVILA DE SOUZA²; KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE³; RAPHAELA CASSOL PICCOLI⁴; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ales_santos@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – anita_a_avila@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kelenqf@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - raphaelacassol@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – solangevegacustodio@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A inflamação desempenha um papel central na progressão de diversas doenças neurológicas (LENG e EDISON, 2021). Dentre os mecanismos que regulam os processos inflamatórios, destaca-se o sistema purinérgico, responsável por mediar a sinalização de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, como ATP e adenosina (BURNSTOCK e BOEYNAEMS, 2014; CIEŚLAK e WOJTCZAK, 2018). Enquanto o ATP extracelular induz respostas pró-inflamatórias, a adenosina exerce efeitos anti-inflamatórios (DI VIRGILIO, 2012 e IDZKO, FERRARI e ELTZSCHIG, 2014). A sinalização induzida pelo ATP e adenosina é regulada pela ação de enzimas como NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina desaminase (ADA) (IDZKO, FERRARI e ELTZSCHIG, 2014).

Paralelamente, a neurotransmissão colinérgica pode ser comprometida em processos inflamatórios, com a acetilcolina sintetizada e liberada dos linfócitos desempenhando um papel imunomodulador. A sinalização induzida pela acetilcolina correlaciona-se diretamente com a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima encontra-se presente tanto em linfócitos T quanto B (TAYEBATI et al., 2002) e há muito tem sido demonstrado que uma inibição ou ausência da AChE altera a função dos linfócitos (CHANDRA e MADHAVANKUTTY, 1975), destacando assim o papel relevante que esta enzima possui no sistema imune. O papel destas enzimas tem sido avaliado em várias doenças, demonstrando que estas podem ser importantes alvos terapêuticos em diversas condições patológicas (BITENCOURT et al., 2019; SOREQ e SEIDMAN, 2001). Desta forma, a busca de compostos que possam modular a atividades destas enzimas torna-se relevante no contexto da inflamação.

O ácido elágico (AE), um polifenol com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tem demonstrado potencial terapêutico em modelos de inflamação (DORNELLES et al., 2020; UMESALMA e SUDHANDIRAN, 2010). Evidências sugerem que o AE atua tanto na mitigação dos danos causados pelo estresse oxidativo quanto na regulação da resposta inflamatória (JHA, PANCHAL e SHAH, 2018). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do AE sobre enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em linfócitos de ratos expostos à administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), um potente indutor de inflamação sistêmica (KHAN et al., 2019).

2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA 044170/2023-59). Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: Grupo I - Controle (Salina); Grupo II - LPS; Grupo III – LPS + AE (50 mg/kg) e Grupo IV – LPS + AE (100 mg/kg).

Os animais dos grupos II, III e IV receberam uma intraperitoneal de LPS (250 µg/kg) diariamente por 8 dias, enquanto os animais do grupo I receberam apenas água para injetáveis. Uma hora após a injeção, os grupos III e IV receberam AE por via oral, enquanto os grupos I e II receberam solução salina no mesmo volume e via.

No nono dia de experimento, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia. O sangue foi coletado por punção cardíaca e os linfócitos separados usando um gradiente de Ficoll (JAQUES et al., 2011). A atividade das enzimas NTPDase, ADA e AChE foram determinadas conforme metodologias padronizadas (LEAL et al., 2005). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando *GraphPad Prism 8* por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Além disso, todos os dados foram expressos como média ± erro padrão e as diferenças entre os valores médios foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração de LPS elevou significativamente a atividade da NTPDase para os dois substratos (ATP e ADP) (Figura 1). O tratamento com AE, nas doses de 50 e 100 mg/kg, foi capaz de prevenir essas alterações na atividade da NTPDase. Não foram observadas alterações significativas na atividade da ADA em nenhum dos grupos avaliados (Figura 1). O ATP extracelular é uma importante molécula com ações inflamatórias. Os resultados sugerem que a ativação da enzima NTPDase pelo LPS pode representar um mecanismo compensatório para reduzir o processo inflamatório (KHAN et al., 2019, AKINTUNDE e OBOH, 2020).

Ainda, os dados deste estudo demonstram que o AE exerce um efeito modulador sobre o sistema purinérgico, possivelmente promovendo um efeito anti-inflamatório, através do aumento dos níveis de adenosina (AHMED et al., 2016; JHA, PANCHAL e SHAH, 2018).

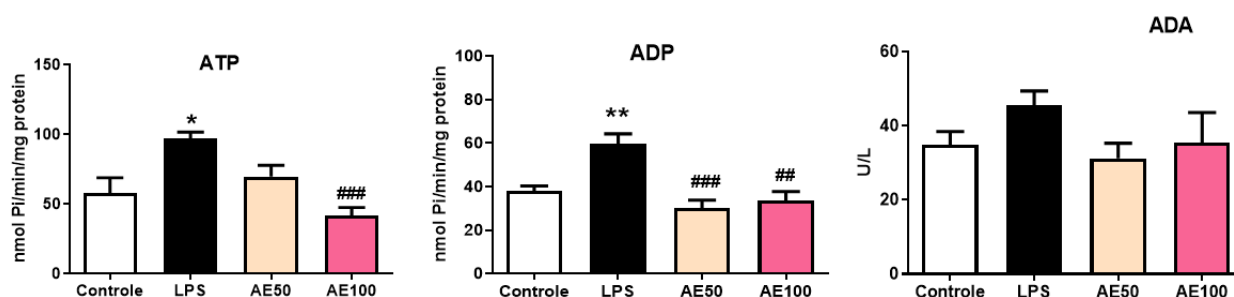


Figura 1 – Efeito do tratamento com AE (50 e 100 mg/kg) nos atividade da NTPDase, usando ATP e ADP como substratos, e na atividade da adenosina desaminase (ADA) em linfócitos de ratos expostos à injeção intraperitoneal de LPS (250 µg/kg). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS (n = 05).

Em relação a atividade da AChE, semelhante a outros estudos que empregaram o LPS como indutor de inflamação, este trabalho também evidenciou um aumento na atividade da AChE em linfócitos (Figura 2) (DAS, 2012; DE

OLIVEIRA, et al., 2012). Esse aumento na atividade da AChE pode reduzir os níveis de acetilcolina, uma molécula com ações anti-inflamatórias. A redução da atividade de AChE observada nos grupos tratados com AE em ambas as doses sugere que o composto pode ajudar a preservar a sinalização colinérgica nos linfócitos, prolongando a ação da acetilcolina. Este resultado reforça os achados de outros estudos que demonstram o efeito anticolinesterásico do AE (AHMED et al., 2016; DORNELLES et al., 2020).

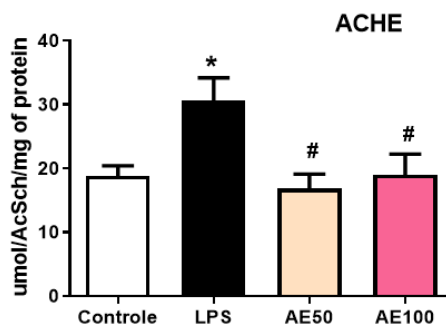


Figura 2 - Efeito do tratamento com AE (50 e 100 mg/kg) na atividade da AChE em linfócitos de ratos submetidos a um modelo de inflamação induzido por injeção intraperitoneal de LPS (250 µg/kg). *P<0,05 quando comparado ao grupo controle. #P<0,05 quando comparado ao grupo LPS (n = 05).

Esses resultados são fortalecidos por evidências que destacam as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do AE, conforme relatado em estudos anteriores (AKINTUNDE e OBOH, 2020; DORNELLES et al., 2020). Dessa forma, os efeitos observados do AE sobre as enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico neste estudo reforçam seu potencial como agente terapêutico em condições inflamatórias, onde a ativação exacerbada de linfócitos pode estar associada ao desenvolvimento e a progressão de diversas doenças.

4. CONCLUSÕES

O AE foi capaz de prevenir as alterações em enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em linfócitos de ratos expostos ao LPS. Essas descobertas sugerem que a AE pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de condições inflamatórias. No entanto, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos específicos de ação do AE, bem como sua eficácia em longo prazo e suas possíveis interações com outras vias biológicas envolvidas em processos inflamatórios. Esses futuros estudos poderão validar o AE como uma alternativa segura e eficaz para o tratamento de diversas patologias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, T. et al. Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: a mini review. **Current Pharmaceutical Design**, 22(10):1350–1360, 2016.
- BITENCOURT, E.M. et al. Doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos, qualidade de vida, estratégias terapêuticas da fisioterapia e biomedicina. **Inova Saúde**, v. 8, n. 2, p. 138-157, 2019.
- BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J. M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, New York, v.10, n.4, p.529-564, 2014.

- CHANDRA, R. K.; MADHAVANKUTTY, K. Effect of cholinesterase inhibition by eserine and phospholipase D on human T lymphocyte Rosetting. *Experientia*, 31(7), 858–859, 1975.
- CIEŚLAK, M.; WOJTCZAK, A. Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. **Purinergic Signalling**, 14(4), 331-344, 2018.
- DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. **Annals of Hepatology**, 11(3):409-11, 2012
- DE OLIVEIRA, P. et al. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, 51(2), 129–137, 2012.
- DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, 72(21), 5441-5447, 2012.
- DORNELLES, G.L. et al. Ellagic Acid Inhibits Neuroinflammation and Cognitive Impairment Induced by Lipopolysaccharides. **Neurochemical Research**, 45, 2456–2473, 2020.
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H.K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**, Londres, 509 (7500), 310-317, 2014.
- JAQUES, J.A. et al. A method for isolation of rat lymphocyte-rich mononuclear cells from lung tissue useful for determination of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. **Analytical biochemistry**, 410(1), 34–39, 2011.
- JHA, A.B.; PANCHAL, S.S.; SHAH, A. Ellagic acid: insights into its neuroprotective and cognitive enhancement effects in sporadic Alzheimer's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 175:33–46, 2018.
- LEAL, D.B. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et biophysica acta**, 1721(1-3), 9–15, 2005.
- LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology**, 17(3), 157-172, 2021.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, 2(4), 294-302, 2001.