

## EXTRATO PADRONIZADO DE *Ilex paraguariensis* ATIVA Nrf2 EM ASTRÓCITOS PRIMÁRIOS EXPOSTOS AO LIPOPOLISSACARÍDEO

VANIZE MACKEDANZ LÜDTKE<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>2</sup>; EDUARDA PACKOWSKI BRAGA<sup>3</sup>; WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>4</sup>; VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>5</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [vanizemackedanz@yahoo.com.br](mailto:vanizemackedanz@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nathaliastark@hotmail.com](mailto:nathaliastark@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [dudabraaga@gmail.com](mailto:dudabraaga@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [williamwwe@yahoo.com.br](mailto:williamwwe@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fmstefanello@gmail.com](mailto:fmstefanello@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* (Araliaceae), popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie nativa da América do Sul de grande relevância econômica e social. Seus benefícios à saúde e propriedades farmacológicas têm sido atribuídos à sua rica composição, incluindo os compostos fenólicos, que conferem atividades antioxidante, neuroprotetora e anti-inflamatória (GAWRON-GZELLA *et al.*, 2021). No entanto, os efeitos da erva-mate sobre as células do sistema nervoso central (SNC) ainda são pouco conhecidos.

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes e desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase cerebral, fornecendo suporte estrutural, fatores tróficos e defesas antioxidantes aos neurônios. Dentre outros mecanismos, defesas antioxidantes podem ser mediadas pela via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), bem como pela ativação de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2021). Além disso, os astrócitos atuam na modulação da neuroinflamação, participandoativamente das respostas imunes. Dados na literatura indicam que o processo neuroinflamatório e o estresse oxidativo contribuem para o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (KWON; KOH, 2020). Nesse sentido, os astrócitos representam um promissor alvo terapêutico para distúrbios do SNC.

O lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é amplamente utilizado em estudos experimentais de neuroinflamação por induzir respostas inflamatórias robustas. Ao se ligar ao receptor Toll-like 4 (TRL-4), o LPS ativa vias de sinalização que desencadeiam inflamação e estresse oxidativo (SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SAŁAT, 2022).

Diante disso, este trabalho pretende investigar os efeitos glioprotetores do extrato padronizado de *I. paraguariensis* (EIP) em culturas primárias de astrócitos submetidas a um modelo *in vitro* de neuroinflamação induzido por LPS. Foram avaliadas a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD e a expressão de RNAm de GPx, SOD2 e Nrf2.

### 2. METODOLOGIA

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

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas de córtex cerebral de ratos *Wistar* (1-2 dias) de acordo com o protocolo previamente descrito por GOTTFRIED *et al.* (1999) e mantidas sob condições padrão de cultivo celular (5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C e atmosfera umidificada) por 20 dias. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 015015/2024-14).

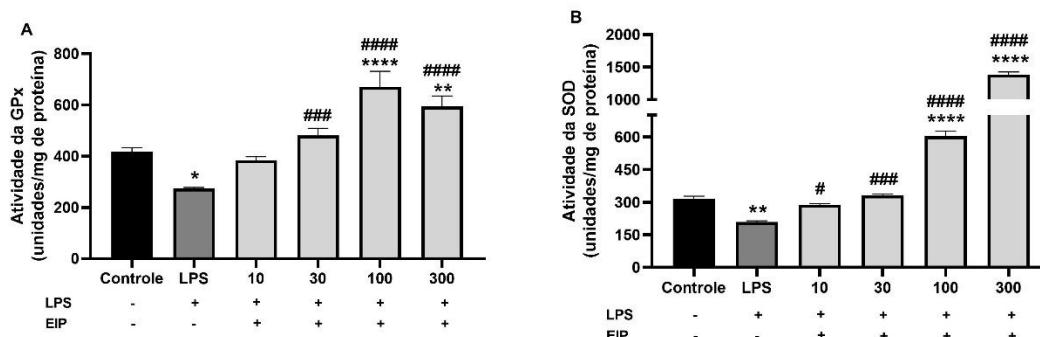
Após a maturação celular, as células foram tratadas com o EIP nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/mL por 24 horas. Posteriormente, foram expostas ao LPS (1 µg/mL) durante 3 horas. As células mantidas apenas em DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino foram consideradas como controle.

No lisado celular foram analisadas as atividades de enzimas antioxidantes como a SOD (MISRA; FRIDOVICH, 1972) e a GPx (Randox Laboratories Ltd., UK). Ademais, a quantificação da expressão dos genes GPx, SOD2 e Nrf2 foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram avaliados através da análise de variância (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

Neste estudo foi demonstrado uma redução significativa na atividade das enzimas antioxidantes GPx ( $P<0,05$ ; Fig. 1A) e SOD ( $P<0,01$ ; Fig. 1B) em astrócitos expostos ao LPS, em comparação ao grupo controle. O tratamento com EIP previneu a redução das atividades da GPx nas concentrações de 30 µg/mL ( $P<0,001$ ), 100 µg/mL e 300 µg/mL ( $P<0,0001$ ) (Fig. 1A), e da SOD em todas as concentrações testadas ( $P<0,05$  para 10 µg/mL,  $P<0,001$  para 30 µg/mL e  $P<0,0001$  para 100 e 300 µg/mL) (Fig. 1B), em comparação ao grupo LPS.

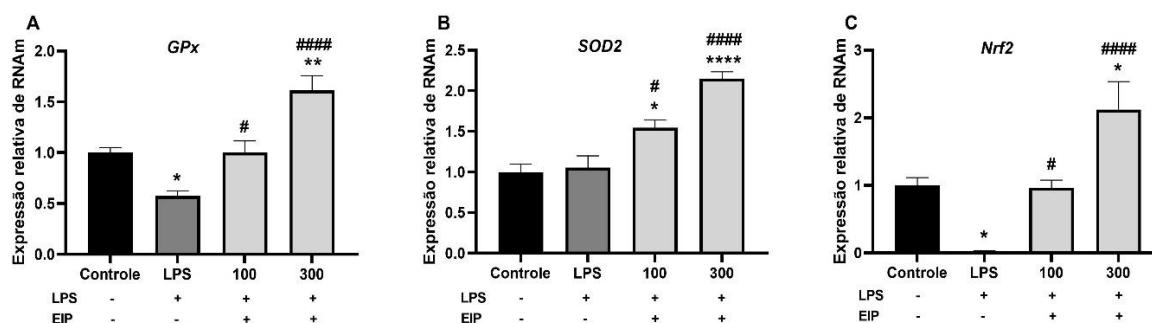
A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes pode favorecer o acúmulo de espécies reativas, como demonstrado em estudos anteriores que relacionaram o LPS ao estresse oxidativo em astrócitos (PACHECO *et al.*, 2018). O efeito protetor do EIP pode estar associado ao alto teor de compostos fenólicos, como o ácido clorogênico, conhecido por sua capacidade antioxidante agindo como quelante de metais e sequestrante de espécies reativas, como radicais hidroxila e ânions superóxido e peroxinitrito (BECKER *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Efeito do tratamento de EIP sobre a atividade das enzimas GPx (A) e SOD (B) em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS. Dados expressos como média ± E.P.M. 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. #\*\* $P<0,001$  e ##### $P<0,0001$  comparado ao grupo LPS.

Com base nesses achados bioquímicos, foram investigados os mecanismos moleculares envolvidos. O tratamento com LPS diminuiu significativamente a expressão de RNAm de *GPx* ( $P<0,05$ ; Fig. 2A) sem afetar os níveis de *SOD2*. O EIP previniu a diminuição da expressão de *GPx* nas concentrações de 100 µg/mL ( $P<0,05$ ) e 300 µg/mL ( $P<0,0001$ ) em relação ao grupo LPS. Além disso, o EIP aumentou a expressão de *SOD2* em astrócitos tratados com LPS nas concentrações de 100 µg/mL ( $P<0,05$ ) e 300 µg/mL ( $P<0,0001$ ) (Fig. 2B).



**Figura 2.** Efeito do tratamento de EIP sobre a expressão relativa de RNAm de *GPx* (A), *SOD2* (B) e *Nrf2* (C) em cultura primária de astrócitos expostos ao LPS.

Dados expressos como média ± E.P.M. de três experimentos independentes ( $n=5$ ), 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. # $P<0,05$  e ##### $P<0,0001$  comparado ao grupo LPS.

A expressão de diversos genes antioxidantes é regulada pelo Nrf2, fator chave na manutenção da homeostase redox em neurônios e astrócitos (VARGAS; JOHNSON, 2009). Em condições basais, Nrf2 permanece inativo no citoplasma, ligado à proteína KEAP1 e direcionado à degradação. Sob estresse oxidativo ou na presença de compostos fenólicos, o Nrf2 dissocia-se de KEAP1, transloca-se ao núcleo e ativa genes por meio dos elementos de resposta antioxidant (ARE) (CARDOZO et al., 2013). Em nosso estudo, o LPS reduziu a expressão de RNAm de *Nrf2* em astrócitos ( $P<0,05$ ; Fig. 1C), enquanto o tratamento com EIP previniu essa redução, promovendo aumento significativo da expressão relativa em 100 µg/mL ( $P<0,05$ ) e 300 µg/mL ( $P<0,0001$ ). Esses dados sugerem que a ativação da via Nrf2 contribui para o efeito glioprotetor do EIP frente ao LPS. Considerando o papel central da neuroinflamação e do estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, estratégias que estimulem precocemente a resposta antioxidante podem representar abordagens promissoras na prevenção ou atenuação do comprometimento cognitivo nos estágios iniciais dessas condições.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o EIP exerce um efeito glioprotetor em astrócitos expostos ao LPS, preservando a atividade de enzimas antioxidantes e modulando positivamente a expressão dos genes *GPx*, *SOD2* e *Nrf2*. Esses achados sugerem o envolvimento da via Nrf2 no mecanismo antioxidante do extrato, destacando seu potencial terapêutico em condições associadas à neuroinflamação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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. et al. Mate - A Long but Current History. **Nutrients**, v.13:3706, p.1-19, 2021.
- 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.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, p.3170-3175, 1972.
- 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.
- QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Gliotoxicity and glioprotection: the dual role of glial cells. **Molecular Neurobiology**, 58:6577-6592, 2021.
- SKRZYPCZAK-WIERCIOCH A.; SAŁAT, K. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future directions for its use. **Molecules**, 27:5481, 2022.
- VARGAS, M.R.; JOHNSON, J.A. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 11:e17, 2009.