

ÁCIDO ELÁGICO PREVINE ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DE ECTONUCLEOTIDASES EM SORO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS A UM MODELO DE INFLAMAÇÃO

ALESSANDRA DOS SANTOS¹; KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE²;
RAPHAELA CASSOL PICCOLI³; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO⁴; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – ales_santos@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – kelenqf@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - raphaelacassol@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – solangevegacustodio@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A inflamação crônica é um fator patológico central na progressão de diversas doenças (LENG et al., 2021). A exposição a agentes indutores, como o lipopolissacarídeo (LPS), pode causar inflamação sistêmica, que culmina em neuroinflamação, caracterizada pela ativação de células da glia e pela produção de mediadores pró-inflamatórios no cérebro (KHAN et al., 2019). Nesse cenário, o sistema purinérgico desempenha um papel crucial na modulação da resposta inflamatória. Enquanto a liberação de nucleotídeos extracelulares como ATP e ADP ativa vias pró-inflamatórias, a adenosina, produto da sua degradação, exerce efeitos anti-inflamatórios. O equilíbrio entre essas moléculas é regulado por ectoenzimas como a NTPDase, a 5'-nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA). (LENZ et al., 2020).

O ácido elágico (AE), um polifenol com vastas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tem demonstrado potencial terapêutico em modelos de inflamação, atuando em múltiplas vias de sinalização e regulando a produção de mediadores inflamatórios (DORNELLES et al., 2020). Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do AE sobre as enzimas do sistema purinérgico no soro de ratos machos e fêmeas expostos ao LPS. A inclusão de ambos os sexos é crucial, pois as diferenças biológicas e hormonais exercem uma influência significativa na resposta imune e inflamatória, fornecendo uma compreensão mais completa da farmacologia do composto e da fisiopatologia da inflamação (CAMPOREZ et al., 2019).

2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 044170/2023-59). Ratos Wistar adultos foram divididos em quatro grupos: Grupo I - Controle; 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 injeções intraperitoneais de LPS (250 µg/kg) durante 8 dias, enquanto os animais do grupo I receberam apenas água para injetáveis. Uma hora após cada injeção, os grupos III e IV receberam AE por via oral, enquanto os grupos I e II receberam solução salina no mesmo volume (1 mL/kg) e via.

No nono dia de experimento, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. As atividades da NTPDase e da 5'-nucleotidase foram avaliadas conforme descrito por OSES et al. (2004). A atividade da ADA foi determinada de acordo com o método descrito por GIUSTI E GALANTI (1984).

Para as análises estatísticas, foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, com os resultados sendo apresentados como média \pm erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração sistêmica de LPS induziu alterações significativas nas atividades das enzimas do sistema purinérgico no soro dos animais. A atividade da NTPDase foi elevada em ambos os sexos após o tratamento com LPS (**Figuras 1 e 2**), tanto para o substrato ATP quanto para o ADP. Essa elevação é um mecanismo de defesa crucial para mitigar a inflamação, convertendo rapidamente o pró-inflamatório ATP em adenosina, uma molécula anti-inflamatória. O tratamento com AE previu eficazmente esse aumento, sugerindo que o composto atenuou o estímulo inflamatório subjacente, possivelmente tornando desnecessária a resposta compensatória do sistema purinérgico (VUERICH et al., 2019). A atividade da 5'-nucleotidase, por sua vez, não foi significativamente alterada pelo LPS, mas foi modulada pelo AE de forma complexa, com efeitos distintos entre machos e fêmeas (**Figuras 1C e 2C**). Essa observação sugere que o AE interage de maneira pleiotrópica e específica do sexo com a cascata purinérgica, demonstrando que sua ação não é uma inibição generalizada, mas uma modulação fina e contextual (BOEHNING et al., 2018).

Ectonucleotidases - soro M

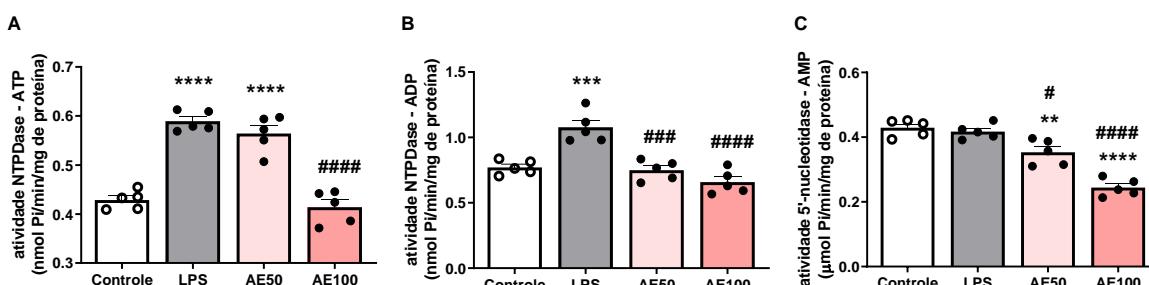


Figura 1 – Atividade de ectonucleotidases em amostras de **soro de ratos machos** submetidos a um modelo de inflamação induzida por LPS e tratados com AE. **A)** Atividade da NTPDase, utilizando ATP como substrato. **B)** Atividade da NTPDase, utilizando ADP como substrato. **C)** Atividade da 5'-nucleotidase, utilizando AMP como substrato. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ em comparação ao grupo controle. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ e ##### $P < 0,0001$ em comparação ao grupo LPS.

Ectonucleotidases - soro F

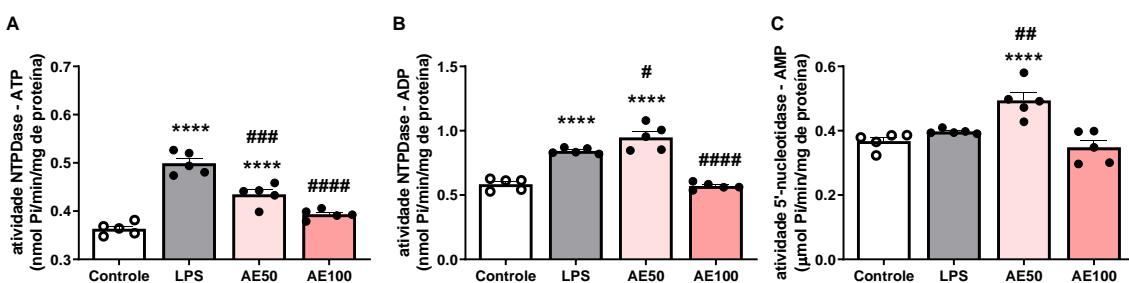


Figura 2 – Atividade de ectonucleotidases em amostras de **soro de ratas** submetidas a um modelo de inflamação induzida por LPS e tratadas com AE. **A)** Atividade da NTPDase, utilizando ATP como substrato. **B)** Atividade da NTPDase, utilizando ADP como substrato. **C)** Atividade da 5'-nucleotidase, utilizando AMP como substrato. **** $P < 0,0001$ em comparação ao grupo controle. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ ### $P < 0,001$ e ##### $P < 0,0001$ em comparação ao grupo LPS.

Avançando na cascata purinérgica, a atividade da ADA foi significativamente aumentada pelo LPS em ambos os sexos, com uma elevação mais acentuada nos machos ($P<0,0001$ - **Figura 3A**) do que nas fêmeas ($P<0,01$ - **Figura 3B**) em comparação a seus respectivos controles. O aumento da ADA pelo LPS pode diminuir os níveis de adenosina, uma molécula com ações anti-inflamatórias. A resposta mais robusta da ADA nos machos corrobora a literatura que aponta para um dimorfismo sexual na resposta inflamatória, possivelmente mediado pela ação protetora dos hormônios sexuais femininos (ANTONIOLI et al., 2012). O tratamento com AE reverteu o aumento da atividade da ADA em ambos os sexos, reforçando a sua capacidade de restaurar o equilíbrio purinérgico.

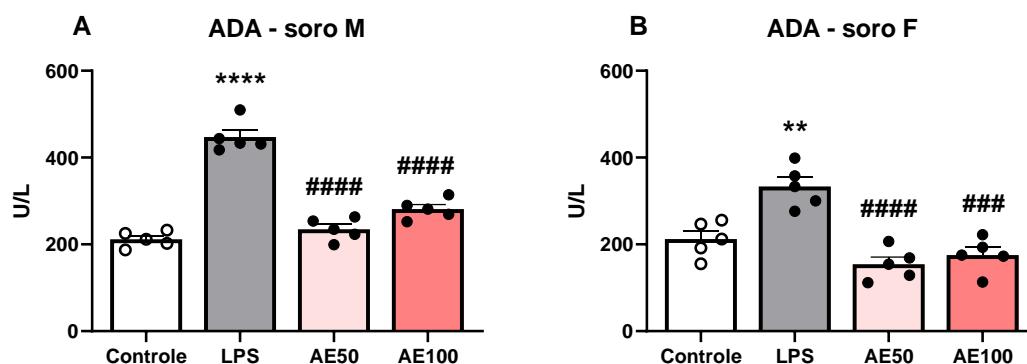


Figura 3 - Atividade da ADA no **soro de ratos machos (A)** e **fêmeas (B)** submetidos a um modelo de inflamação induzida por LPS e tratados com AE. ** $P<0,01$ e *** $P<0,0001$ em comparação ao grupo controle. ### $P<0,001$ e #### $P<0,0001$ em comparação ao grupo LPS.

A administração sistêmica de LPS induziu alterações na resposta purinérgica periférica, caracterizada pelo aumento da atividade da NTPDase e da ADA para mitigar a inflamação. O AE, ao normalizar as atividades enzimáticas no soro, demonstra sua capacidade de reduzir o estímulo inflamatório sistêmico possivelmente em vias mais iniciais relacionadas ao processo inflamatório (CHEN et al., 2024). Os dados demonstraram que existem algumas variações na atividade das ectonucleotidases em ratos machos e fêmeas que receberam AE. Estudos da literatura sugerem que as fêmeas, beneficiadas por uma proteção hormonal inata, apresentariam uma resposta inflamatória menos severa que os machos (MONTEIRO et al., 2014). Essa diferença não é apenas um resultado interessante, mas uma evidência que apoia a necessidade de análises sexo-específicas em pesquisas biomédicas, reconhecendo que as respostas fisiopatológicas e as eficácia terapêuticas podem variar fundamentalmente entre machos e fêmeas.

Os resultados deste estudo reforçam o potencial do AE como um agente terapêutico para condições inflamatórias. A capacidade do AE de modular a via purinérgica o posiciona como um candidato promissor para futuras investigações clínicas (BOEHNING et al., 2018).

4. CONCLUSÕES

O AE foi capaz de prevenir alterações na atividade de ectonucleotidases em soro tanto de ratos machos quanto fêmeas submetidos a um modelo de inflamação induzido pelo LPS. A análise sexo-dependente revelou algumas diferenças na resposta ao tratamento ressaltando a importância de considerar o dimorfismo sexual no desenho e na interpretação de estudos pré-clínicos. Essas descobertas não apenas reforçam o potencial do AE como uma alternativa promissora para o

tratamento de patologias neuroinflamatórias, mas também fornecem uma nova perspectiva sobre a complexa interação entre inflamação, sexo biológico e a respostas a agentes bioativos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842–862, 2012.
- BOEHNING, A. L. et al. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 411–418, 2018.
- CAMPOREZ, J. P. et al. Anti-inflammatory effects of oestrogen mediate the sexual dimorphic response to lipid-induced insulin resistance. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 15, p. 3885–3903, 2019.
- CHEN, F. et al. Oral administration of ellagic acid mitigates perioperative neurocognitive disorders, hippocampal oxidative stress, and neuroinflammation in aged mice by restoring IGF-1 signaling. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2509, 2024.
- DORNELLES, G. L. et al. Ellagic Acid Inhibits Neuroinflammation and Cognitive Impairment Induced by Lipopolysaccharides. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 10, p. 2456–2473, 2020.
- GIUSTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 3, p. 315–323, 1984.
- KHAN, M. H. et al. Lipopolysaccharide-induced systemic inflammation. **Inflammation Research**, v. 68, p. 775-786, 2019.
- LENG, F. et al. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157-172, 2021.
- MERIGHI, S. et al. Alzheimer and Purinergic Signaling: Just a Matter of Inflammation? **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1267, 2021.
- MONTEIRO, R. et al. Estrogen signaling in metabolic inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2014.
- OSES, J. P. et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v. 74, n. 26, p. 3275–3284, 2004.
- VUERICH, M. et al. Ectonucleotidases in Intestinal and Hepatic Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 507, 2019.