

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – CCQFA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Ácido elágico previne a citotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo em
cultivo primário de astrócitos**

Thais Marini da Rosa

Pelotas, 2024

Thais Marini da Rosa

Ácido elágico previne a citotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo em cultivo primário de astrócitos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Roselia Maria Spanevello

Coorientadora: Dra. Nathalia Stark Pedra

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

R788a Rosa, Thais Marini da

Ácido elágico previne a citotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo em cultivo primário de astrócitos [recurso eletrônico] / Thais Marini da Rosa ; Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Nathalia Stark Pedra, coorientadora. — Pelotas, 2024.

75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Ácido elágico. 2. Estresse oxidativo. 3. Doenças neuroinflamatórias. 4. Astrócitos. 5. Mediadores inflamatórios. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Pedra, Nathalia Stark, coorient. III. Título.

CDD 616.80072

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Thais Marini da Rosa

Ácido elágico previne a citotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo em cultivo primário de astrócitos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18/04/2024

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ROSELIA MARIA SPANEVELLO
Data: 12/06/2024 14:00:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Roselia Maria Spanevello (Orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente
 ADRIANO MARTIMBIANCO DE ASSIS
Data: 13/06/2024 14:01:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis

Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal de Rio grande do Sul

Documento assinado digitalmente
 ROBERTO FARINA DE ALMEIDA
Data: 12/06/2024 17:52:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Roberto de Farina de Almeida

Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal de Rio grande do Sul

Dedico este trabalho ao meu avô e à
todos que acreditaram e me apoiaram
até aqui.

Agradecimentos

Gostaria de expressar profunda gratidão à minha orientadora, Roselia, pelo seu apoio e contribuição durante todo o meu período no mestrado. Sua dedicação e encorajamento foram fundamentais para o sucesso desta jornada acadêmica. As importantes ideias que você compartilhou comigo foram essenciais, não apenas para a realização do meu trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional. Também quero agradecer à minha co-orientadora, Nathalia, cujo conhecimento transmitido, acolhimento e incentivo no laboratório contribuíram muito para o meu desenvolvimento na pós-graduação.

Agradeço à minha amiga e colega de laboratório, Larissa, pela parceria ao longo do mestrado que não apenas construiu nossa amizade, mas também enriqueceu esta jornada. Além disso, quero expressar gratidão aos meus colegas do grupo de pesquisa NEUROBIO pela experiência compartilhada ao longo desses dois anos juntos. Durante esse período enfrentamos desafios, compartilhamos conhecimento e celebramos inúmeras conquistas. Cada um de vocês foi fundamental, tornando essa experiência marcante e valiosa. Ademais, agradeço à CAPES, ao grupo CARREFOUR, ao PPGBBio e a UFPel pelo fomento à ciência, apoio financeiro e pela formação de qualidade.

Não poderia deixar de agradecer às minhas amigas e colegas de apartamento Amanda e Giulia, pelo apoio inestimável ao longo de todo esse processo. Com elas, compartilhei muitas risadas, comidas gostosas, conversas profundas e momentos especiais que foram fundamentais para tornar essa jornada e a vida mais leves. A presença de vocês foi importante para a conclusão do meu mestrado. Agradeço também ao meu companheiro, Cid, pelo seu amor, apoio e compreensão. Sua confiança em mim foi crucial para eu manter o foco, mesmo em momentos quando até eu mesma duvidava.

Por fim, agradeço às minhas melhores amigas Aline e Olívia por todo o carinho, compreensão e cumplicidade durante esses 9 anos de amizade e, especialmente agora, enquanto me dediquei à conclusão do mestrado. Vocês sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais importantes. Sou grata à minha família pelo afeto e encorajamento constantes, mesmo estando longe. Ao meu querido avô, que embora não esteja mais entre nós, sua sabedoria e amor continuam sendo inspirações constantes em minha vida. Seus valores e

exemplos moldaram quem sou hoje, e por isso, serei eternamente grata.
Agradeço por ter ao meu lado pessoas tão especiais.

"Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda."

(Paulo Freire)

Resumo

ROSA, Thais Marini. **Ácido elágico previne a citotoxicidade induzida por lipopolissacarídeo em cultivo primário de astrócitos**. 2024. Nº 75f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

A neuroinflamação é um mecanismo complexo que envolve a ativação de células gliais, como astrócitos e micróglia, em resposta a danos cerebrais. A ativação dos astrócitos é marcada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento do estresse oxidativo. Compostos que modulam a liberação desses mediadores têm sido alvo terapêutico promissor. O ácido elágico (AE), um composto fenólico encontrado em muitas fontes vegetais, é reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras. Este estudo investigou o efeito do AE em astrócitos de ratos neonatos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS). Os astrócitos foram pré-tratados com AE (50, 100 e 200 μ M) por 48 horas e, em seguida, expostos ao LPS (1 μ g/ml) por três horas. Foram avaliados parâmetros de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo. O tratamento com AE preveniu a diminuição da viabilidade celular e o aumento na proliferação induzidos pelo LPS. O AE (100 μ M) preveniu o aumento da expressão gênica de IL-1 β e TNF- α , enquanto regulou positivamente a expressão de IL-6 e GSK3- β . Além disso, AE preveniu o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitritos induzido pelo LPS, e a redução nos níveis de sulfidrilas e das enzimas superóxido dismutase, catalase, e glutathione S-transferase. Esses resultados sugerem o potencial terapêutico do AE em atenuar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo em astrócitos, oferecendo base para futuras investigações sobre os mecanismos glioprotetores do AE associados à neuroinflamação.

Palavras chaves: Ácido Elágico; Doenças Neuroinflamatórias; Mediadores Inflamatórios, Estresse Oxidativo; Astrócitos

Abstract

ROSA, Thais Marini. **Ellagic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in primary astrocyte culture**. 2024. N° 75f. Dissertation (Master's degree) - Post-graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas.

Neuroinflammation is a complex mechanism involving the activation of glial cells, such as astrocytes and microglia, in response to brain damage. Astrocyte activation is marked by the release of pro-inflammatory cytokines and an increase in oxidative stress. Compounds that modulate the release of these mediators have become promising therapeutic targets. Ellagic acid (EA), a phenolic compound found in many plant sources, is recognized for its anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties. This study investigated the effect of EA on astrocytes from neonatal rats exposed to lipopolysaccharide (LPS). Astrocytes were pre-treated with EA (50, 100, and 200 μ M) for 48 hours and then exposed to LPS (1 μ g/ml) for three hours. Parameters of cytotoxicity, inflammation, and oxidative stress were evaluated. EA treatment prevented the LPS-induced decrease in cell viability and increase in proliferation. EA (100 μ M) prevented the increase in IL-1 β and TNF- α gene expression while positively regulating IL-6 and GSK3- β expression. Additionally, EA prevented the LPS-induced increase in reactive oxygen species and nitrites and the reduction in sulfhydryl levels and the enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase. These results suggest the therapeutic potential of EA in attenuating the inflammatory response and oxidative stress in astrocytes, providing a basis for future investigations into the glioprotective mechanisms of EA associated with neuroinflammation.

Keywords: Ellagic Acid; Neuroinflammatory Diseases; Inflammation Mediators; Oxidative Stress; Astrocytes

Lista de figuras

Figura 1: Formação do ácido elágico	23
Figura 2: Mecanismo antioxidante do AE.....	60
Figura 3: Mecanismo de anti-inflamatório do AE.....	62

Lista de abreviaturas e siglas

AE	Ácido elágico
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET	Elagitanino
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPxs	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-transferase
GSK3- β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HHDP	Hexa-hidroxidifenol
HO-1	Heme oxygenase 1
IL	Interleucina
INOS	Óxido nítrico sintase induzível
JAK1	Janus quinase 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NMP	N-metil-2-pirrolidona

NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidada
Nrf2	Fator nuclear E2 relacionado ao fator 2
PAMP	Reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos
PPR	Receptores de reconhecimento de padrões
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRL	Receptores Toll-like

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Astrócitos	14
3.2	Papel dos astrócitos na neuroinflamação.....	15
3.3	Estresse oxidativo e a neuroinflamação.....	18
3.4	Modelo de neuroinflamação com Lipopolissacarídeo	20
3.5	Ácido elágico.....	22
4	MANUSCRITO	26
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO.....	71

1 INTRODUÇÃO

O ácido elágico (AE) é um composto fenólico encontrado em uma variedade de fontes vegetais, incluindo frutas como romãs, morangos, framboesas, bem como em algumas ervas e sementes (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Sua estrutura química é caracterizada por uma porção hidrofílica contendo quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona e por uma porção lipofílica com dois anéis bifenílicos (Yamada *et al.*, 2018). Essa estrutura confere ao AE várias propriedades biológicas importantes tais como ações antioxidantes e anti-inflamatórias, tornando-o assim objeto de interesse em estudos relacionado a doenças do sistema nervoso central (SNC) (Gupta *et al.*, 2021). Portanto, explorar os efeitos do AE em mecanismos associados a neuroinflamação e estresse oxidativo pode fornecer descobertas importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças do SNC.

A neuroinflamação é um processo complexo caracterizado pela ativação de células gliais em resposta a estímulos patológicos, como lesões, infecções ou traumas. Entre as células gliais, os astrócitos desempenham um papel importante na resposta inflamatória (Kwon *et al.*, 2020). Durante a neuroinflamação, os astrócitos são ativados e passam por alterações em sua morfologia e função. Eles desempenham um papel multifuncional na modulação da resposta inflamatória, liberando uma variedade de mediadores, incluindo citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas. Essa ativação astrocitária, quando torna-se crônica, tem sido associada ao desenvolvimento e a progressão de várias doenças neurológicas, tais como doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (Patani *et al.*, 2023).

Paralelamente, o estresse oxidativo decorrente do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante do organismo, desempenha um papel significativo no dano neuronal e na progressão dessas doenças. O acúmulo de espécies reativas resulta em danos a lipídios, proteínas e DNA, ocasionando disfunção e morte celular (Teleanu *et al.*, 2022). Diante disso, os astrócitos respondem ativando mecanismos de defesa antioxidante. Contudo, em condições de estresse crônico ou excessivo, essas células se

tornam reativas, contribuindo para a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Chen *et al.*, 2020). Portanto, a compreensão do papel dos astrócitos na regulação do estresse oxidativo e a relação com a neuroinflamação é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas à proteção e preservação da função glial.

O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, tem sido amplamente utilizado induzir neuroinflamação e estresse oxidativo em modelos experimentais (Batista *et al.*, 2019). A exposição ao LPS desencadeia uma resposta inflamatória exacerbada no SNC, caracterizada pela ativação de astrócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de causar danos oxidativos às células (Wiercioch *et al.*, 2022). Nesse contexto, considerando os diversos efeitos farmacológicos e a extensa gama de alvos moleculares do AE, este estudo teve como investigar o potencial glioprotetor do AE mediante a modulação de mecanismos associados ao status redox e a inflamação em astrócitos expostos ao LPS.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do AE em parâmetros de citotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação no cultivo primário de astrócitos expostos ao LPS.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o impacto do AE na viabilidade e biomassa celular em astrócitos expostos ao LPS;
- Investigar os efeitos do tratamento com AE na expressão gênica de marcadores inflamatórios em cultivo primário de astrócitos expostos ao LPS;
- Avaliar o efeito do tratamento com AE no estresse oxidativo em astrócitos expostos ao LPS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Astrócitos

O SNC é composto por neurônios e células gliais tais como oligodendrócitos, micróglia e astrócitos. Os astrócitos são o tipo celular mais abundante no SNC de mamíferos, representando aproximadamente 20% a 40% do número total de células (Zhou *et al.*, 2019). Tais células revestem todas as partes do cérebro e do parênquima da medula espinhal. Os astrócitos possuem inúmeras funções, dentre elas, regular o fluxo sanguíneo, fornecer metabólitos de energia aos neurônios, participar da função sináptica e da plasticidade, manter o equilíbrio de íons e fluidos extracelulares e controlar a produção de neurotransmissores (Li *et al.*, 2020).

Os astrócitos podem ser classificados como protoplasmáticos ou fibrosos, os quais são encontrados principalmente na substância cinzenta e substância branca do cérebro e da medula espinhal, respectivamente. Além disso, eles diferem em função e morfologia dependendo da localização tecidual (Zhou *et al.*, 2019). Astrócitos fibrosos possuem processos semelhantes a fibras que se associam aos nódulos de Ranvier ao longo dos axônios que compõem a substância branca, enquanto que os astrócitos protoplasmáticos possuem processos altamente ramificados que se associam a somas neuronais e sinapses que formam a substância cinzenta (Lawrence *et al.*, 2023).

Por serem o tipo de célula glial mais abundante no SNC, os astrócitos podem formar contatos bidirecionais tanto com os neurônios quanto com as células endoteliais microvasculares que revestem os vasos sanguíneos cerebrais (Allen *et al.*, 2018). Os astrócitos modulam o fluxo sanguíneo local em resposta à atividade neuronal, liberando vasodilatadores como óxido nítrico ou ácido araquidônico e fornecem suporte nutricional para neurônios (Lee *et al.*, 2022). Além disso, os astrócitos promovem a formação, poda e remodelamento de sinapses, bem como a sobrevivência de neurônios e oligodendrócitos através da secreção de fatores de crescimento neurotróficos (Lawrence *et al.*, 2023).

Os astrócitos são um dos principais componentes da barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura vital que separa o sangue circulante do

SNC. Essa barreira é essencial para proteger o SNC de substâncias nocivas e para manter um ambiente adequado para o funcionamento cerebral. Essas células contribuem para a formação e manutenção da estrutura física da BHE mediante seus prolongamentos celulares que se estendem ao redor dos vasos sanguíneos, promovendo a formação de junções estreitas entre essas células (Nortley *et al.*, 2017). Essas junções reduzem a permeabilidade dos capilares, impedindo a passagem de muitas substâncias potencialmente prejudiciais da corrente sanguínea para o cérebro. Além disso, eles controlam ativamente quais substâncias podem passar pela BHE e entrar no ambiente cerebral, bem como absorvem, degradam e removem substâncias que atravessam a BHE, além de regular os níveis de íons, neurotransmissores e outros compostos químicos no meio extracelular (Lawrence *et al.*, 2023).

Os astrócitos também desempenham um papel na síntese e reciclagem de neurotransmissores, influenciando indiretamente a atividade neuronal e, portanto, o consumo de energia cerebral. Dessa forma, o alto fornecimento de energia necessário para a atividade neuronal tem sido relacionado ao uso da glicose como principal substrato energético do cérebro (Nortley *et al.*, 2017). Nesse contexto, os astrócitos possuem a capacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio e quando necessário, esse glicogênio pode ser quebrado em glicose e liberado para os neurônios, fornecendo uma fonte imediata de energia. Além disso, durante a atividade neuronal intensa, os astrócitos podem metabolizar a glicose e liberar lactato, que é então captado pelos neurônios e usado como fonte de energia (Almeida *et al.*, 2023). Dessa forma, os astrócitos exercem diversas funções vitais, evidenciando sua importância fundamental na manutenção da homeostase cerebral e na regulação da função neuronal.

3.2 Papel dos astrócitos na neuroinflamação

A neuroinflamação é um fenômeno complexo caracterizado pela ativação de células gliais como a micróglia e astrócitos no SNC em resposta a estímulos nocivos, como infecções, lesões, toxinas ou traumas (Kwon *et al.*, 2020). Durante o processo, há ativação de células imunes residentes, em destaque os astrócitos

que produzem e liberam mediadores inflamatórios a fim de proteger o SNC contra danos (Giovannoni *et al.*, 2020). Os astrócitos respondem aos insultos no SNC mediante o processo chamado astrogliose reativa, uma resposta de reparo que se caracteriza por hipertrofia dos astrócitos, alongamento protuberante, expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e proliferação celular. Durante a neuroinflamação os astrócitos aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias, em destaque a interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandinas, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Patani *et al.*, 2023).

A GFAP é uma proteína de filamento intermediário do citoesqueleto sendo exclusivamente expressa em astrócitos. Na presença de danos, os astrócitos ativados podem expressar níveis elevados de GFAP como parte de sua resposta à inflamação, o que pode ajudar a modular a resposta imune e proteger o tecido cerebral (Giovannoni *et al.*, 2020). Nesse sentido, a GFAP ajuda a manter a estrutura e a forma dos astrócitos, visto que durante a astrogliose, os astrócitos assumem uma forma mais complexa caracterizada por hipertrofia, aumento de seus prolongamentos e ramificações. Além disso, a expressão de GFAP varia significativamente dependendo de sua localização no SNC, de sua proximidade com o local da lesão e do tipo de lesão. É importante salientar que, a regulação positiva de GFAP é uma característica de muitos, mas não de todos os astrócitos reativos (Li *et al.*, 2020).

A reatividade astrogliar apresenta-se como um espectro com dois fenótipos equidistantes: um fenótipo neurotóxico ou pró-inflamatório (A1) e um fenótipo neuroprotetor ou anti-inflamatório (A2). Os astrócitos com fenótipo anti-inflamatório regulam positivamente muitos fatores neurotróficos e são caracterizados por liberar IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Kwon *et al.*, 2020). Contudo, os astrócitos com fenótipo pró-inflamatório são caracterizados por causarem grandes alterações celulares que incluem proliferação, hipertrofia e regulação positiva de vários genes que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Giovannoni *et al.*, 2020).

Além disso, vários estudos destacam a relação entre glicogênio sintase

quinase 3 beta (GSK3- β) e processos inflamatórios (Calvo *et al.*, 2023; Gianferrara *et al.*, 2022; Lai *et al.*, 2023). A GSK3 β é uma serina-treonina quinase que desempenha um papel regulatório em uma variedade de processos biológicos, incluindo inflamação, crescimento celular, diferenciação celular e metabolismo energético (Calvo *et al.*, 2023). A ativação da enzima GSK3- β nos astrócitos em resposta a estímulos inflamatórios como infecção ou danos, desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β . Por outro lado, a inibição desta enzima suprime a síntese de mediadores pró-inflamatórios e aumenta produção de IL-10 (Lai *et al.*, 2023). Desta forma, a regulação da GSK3- β é fundamental para manter o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias influenciando diretamente os mecanismos de neuroinflamação em uma diversas doenças neurológicas (Gianferrara *et al.*, 2022).

A relação entre os astrócitos e a enzima GSK3- β é de interesse significativo em pesquisas neurobiológicas e na compreensão de doenças neurodegenerativas (Gianferrara *et al.*, 2022; Lai *et al.*, 2023). Os astrócitos, desempenham funções cruciais no suporte neuronal, enquanto a GSK3- β é uma proteína quinase com papel central em diversas vias de sinalização celular. Em condições como a doença de Alzheimer e esclerose múltipla, tanto os astrócitos quanto a GSK3- β podem estar envolvidos, possivelmente influenciando processos como a resposta inflamatória e a comunicação neuronal (Calvo *et al.*, 2023). Embora a interação específica entre astrócitos e GSK3- β ainda esteja sendo explorada, sugere-se que essa relação desempenhe um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos do SNC. Mais pesquisas são necessárias para elucidar completamente essa interação e seu potencial terapêutico em doenças neurológicas.

Durante a neuroinflamação, é importante destacar também que ativação de células gliais como os astrócitos, resulta em uma produção aumentada de ERO e ERN (Li *et al.*, 2020). A produção exacerbada destas espécies reativas têm o potencial de causar danos oxidativos em células gliais e neuronais afetando negativamente o funcionamento do DNA, provocando oxidação de proteínas e peroxidação lipídica das membranas celulares (Alfei *et al.*, 2020). Portanto,

compreender como essas espécies reativas estão associadas com mecanismos de ativação astrócitária e sua contribuição para a neuroinflamação é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para doenças que acometem o SNC.

3.3 Estresse oxidativo e a neuroinflamação

O SNC é conhecido por sua elevada taxa metabólica, correspondendo a aproximadamente 20% do gasto energético total do organismo (Sure *et al.*, 2018). Essa atividade metabólica intensa gera uma grande quantidade de espécies reativas como ERO e ERN, as quais atuam como moléculas sinalizadoras regulando várias funções do SNC. Entretanto, quando a produção destas espécies excede a capacidade antioxidante do SNC, ocorre o fenômeno denominado estresse oxidativo (Salim., 2017). O estresse oxidativo é responsável por causar danos em estruturas celulares contribuindo assim para a progressão e desenvolvimento de doenças neurológicas (Teleanu *et al.*, 2022). Considerando que as pesquisas na área da biologia redox têm destacado que ERO e ERN têm a capacidade de influenciar processos fisiológicos e patológicos no SNC, estratégias terapêuticas visando manter um equilíbrio adequado entre sua produção e neutralização destas espécies tornam-se extremamente importantes na prevenção e tratamento de disfunções cerebrais (Ren *et al.*, 2017).

A produção de ERO envolve predominantemente duas vias principais: a via mitocondrial e a via da NADPH oxidase (NOX). As ERO mitocondriais são geradas principalmente durante o processo de síntese de ATP pela cadeia de transporte de elétrons. Por outro lado, as enzimas da família NOX, presentes na membrana celular de diversas células, também desempenham um papel significativo na geração de ERO. Nos mamíferos, a família NOX é composta por sete isoformas distintas (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2), as quais são enzimas ligadas à membrana compostas por múltiplas subunidades que catalisam a conversão do oxigênio em superóxido, utilizando NADPH como doador de elétrons (Fang *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

No contexto dos astrócitos, a isoforma NOX4 é predominante. Durante condições de estresse ou dano celular nos astrócitos, a atividade da NOX4 pode ser aumentada, resultando em uma maior produção de ERO (Boonpraman *et al.*, 2023). Essas espécies oxidativas podem ter efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais, dependendo do contexto e da magnitude da resposta oxidativa. Além disso, a ativação da NOX4 pode estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e desencadear vias de sinalização inflamatória, contribuindo para a neuroinflamação em situações patológicas (Park *et al.*, 2021). Outras fontes de produção de espécies reativas incluem as oxidases como o citocromo P450, xantina oxidase, lipoxigenase e mieloperoxidase (Chen *et al.*, 2020).

O sistema antioxidante dos astrócitos consiste em duas principais respostas: o sistema antioxidante enzimático e o sistema antioxidante não enzimático. O primeiro inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutathione peroxidase (GPxs), entre outras, cuja regulação é mediada pelo fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Teleanu *et al.*, 2022). A via Nrf2 desempenha um papel crucial como sistema antioxidante endógeno no SNC, sendo o Nrf2 um fator de transcrição induzível que responde à presença de estresse oxidativo. Já sistema antioxidante não enzimático é composto por substâncias redutoras endógenas, como vitamina C, vitamina E, glutathione (GSH), NADPH, ácido úrico, bilirrubina e melatonina os quais desempenham também um papel essencial na neutralização de espécies reativas (Chen *et al.*, 2020).

O glutamato, neurotransmissor excitatório, pode levar à neurotoxicidade quando em excesso, gerando ERO e contribuindo para a sobrecarga de cálcio. Os astrócitos desempenham um papel crucial na regulação do glutamato, e assim podem indiretamente diminuir a produção de ERO provenientes da excitotoxicidade deste neurotransmissor (Andersen *et al.*, 2021). O estresse oxidativo está intimamente relacionado com a neuroinflamação e a ativação astrócitária. Quando expostos a condições que aumentam as ERO e ERN, como o excesso de glutamato, os astrócitos podem ativar vias inflamatórias intracelulares. Essa ativação desencadeia a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, contribuindo para a resposta

inflamatória no SNC (Chen *et al.*, 2020).

Dessa forma, o estresse oxidativo e a neuroinflamação representam fenômenos inter-relacionados nos astrócitos, desempenhando papéis cruciais em diversas condições neurodegenerativas. Nesse sentido, a ativação da neuroinflamação em astrócitos pode ser desencadeada por estímulos pró-oxidativos e pró-inflamatórios, levando à secreção de citocinas mediadores inflamatórios. Esse processo inflamatório, por sua vez, pode amplificar o estresse oxidativo, gerando um ciclo de dano celular e inflamação (Giovannoni *et al.*, 2020). A interação entre estresse oxidativo e neuroinflamação nos astrócitos pode impactar significativamente a função neural, contribuindo para a progressão de doenças neurológicas (Kwon *et al.*, 2020). Assim, a compreensão desses mecanismos subjacentes pode ser crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a essas condições.

3.4 Modelo de neuroinflamação com Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como uma endotoxina, constitui um componente essencial da membrana externa das bactérias gram-negativas, exercendo um papel crucial na integridade estrutural e na permeabilidade da célula bacteriana (Singh *et al.*, 2022). Consistindo em lipídeo A, oligossacarídeo central e polissacarídeo O, também conhecido como antígeno O, o LPS apresenta variações significativas em suas porções centrais, mesmo dentro de uma mesma espécie bacteriana. A estabilidade do LPS é principalmente atribuída ao lipídeo A, embora diferenças químicas, como níveis variáveis de acilação e fosforilação possam influenciar sua imunogenicidade (Batista *et al.*, 2019). Nesse sentido, a forma hexa-acilada do lipídeo A é a mais imunogênica, fornecendo uma base para a distinção imunológica entre bactérias patogênicas e não patogênicas. Essa variante hexa-acilada é comumente encontrada em patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (Geyer *et al.*, 2019).

Para detectar fatores prejudiciais, os astrócitos possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRR), os quais compreendem os receptores Toll-

like (TRLs), que desencadeiam uma cascata de sinalização a fim de promoverem a eliminação de patógenos (Wiercioch *et al.*, 2022). Os PRR são ativados após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que incluem patógenos intactos ou seus componentes, e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) contendo moléculas de células do hospedeiro relacionadas a danos ou morte celular (Rathinam *et al.*, 2019).

Os receptores TLR4 desempenham um papel crucial na detecção e na resposta imunológica contra patógenos. Além disso, a ativação do TLR4 nos astrócitos podem causar alterações na BHE e ativar as vias do fator nuclear kappa B (NF- κ B), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e Janus quinase 1/transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (JAK1/STAT1), que por sua vez regulam a expressão de uma ampla gama de moléculas pró-inflamatórias (Wiercioch *et al.*, 2022). Assim, a ativação crônica do TLR4 desencadeia a morte apoptótica dos astrócitos e a autofagia, principalmente devido à excitotoxicidade induzida pelo glutamato, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial. Nesse contexto, a ativação crônica e anormal dos astrócitos pode interferir na atividade sináptica das redes neuronais, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurológicas (Rathinam *et al.*, 2019).

No SNC, os receptores TLR4 são principalmente expressos em astrócitos micróglia, mas também podem ser encontrados em oligodendrócitos, neurônios e células de Schwann (Wiercioch *et al.*, 2022). A indução da inflamação pode ocorrer de várias maneiras, sendo o LPS uma ferramenta crucial para esse propósito. Um ponto de convergência importante entre a neuroinflamação e a inflamação induzida por LPS é a ativação do TLR4, uma vez que a administração de LPS desencadeia uma resposta inflamatória, resultando em reativação glial, danos a macromoléculas e morte celular. Esse processo envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias, além do aumento da atividade das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e estresse oxidativo (Batista *et al.*, 2019).

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que o LPS induz proliferação celular, dano oxidativo e alterações morfológicas em cultivo

primário de astrócitos corticais de ratos (Fachel *et al.*, 2020; Pacheco *et al.*, 2018). Ainda, Zhou *et al.* (2020), demonstraram que astrócitos do hipocampo de ratos expostos ao LPS (1 µg/mL) aumentaram a secreção das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-1β. Além disso, a ativação da GSK3-β pelo LPS, após a ligação aos receptores TLRs, promove a liberação de citocinas inflamatórias nas células do sistema imunológico inato (Calvo *et al.*, 2023). Assim, esses resultados ressaltam a importância contínua da investigação dos efeitos do LPS nos astrócitos, visando a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes e suas implicações potenciais na neuroinflamação.

Diante dos efeitos prejudiciais induzidos pelo LPS nos astrócitos e sua associação com processos inflamatórios, surge a necessidade de explorar estratégias que possam mitigar tais danos. Nesse contexto, estudos recentes sugerem que o AE, um composto polifenólico encontrado em várias frutas e vegetais, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias significativas (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Portanto, a avaliação do potencial do AE em mitigar os efeitos adversos do LPS nos astrócitos é crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas promissoras, visando proteger a saúde cerebral contra a neuroinflamação.

3.5 Ácido elágico

O AE é um composto polifenólico encontrado naturalmente em uma diversidade de frutas vermelhas, como romãs, framboesas, amoras, morangos, ameixas, e também em nozes. Nas células vegetais, o AE pode ser encontrado em sua forma livre, porém, a maioria está presente em uma molécula mais complexa denominada elagitaninos (ETs) (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Os ETs representam um dos mais diversos grupos de fenólicos vegetais e abrangem mais de 1.000 compostos bioativos naturais identificados. Os ETs estão localizados nos vacúolos e no citoplasma das células vegetais e desempenham um importante papel protetor nas condições naturais de crescimento, fornecendo uma defesa química contra infecções por patógenos microbianos e ataque de herbívoros (Yamada *et al.*, 2018).

De acordo com a sua natureza química, os ETs são taninos hidrolisáveis e constituem o maior grupo entre eles. Durante o processamento químico da planta, tanto sob condições ácidas quanto básicas, as ligações éster dos ETs são hidrolisadas, produzindo um grupo hexa-hidroxidifenoil (HHDP), que se lactoniza espontaneamente formando o AE (**Figura 1**). Por outro lado, o AE livre é comumente formado durante o processamento de alimentos ou em condições fisiológicas no trato gastrointestinal humano (Evtyugin *et al.*, 2020).

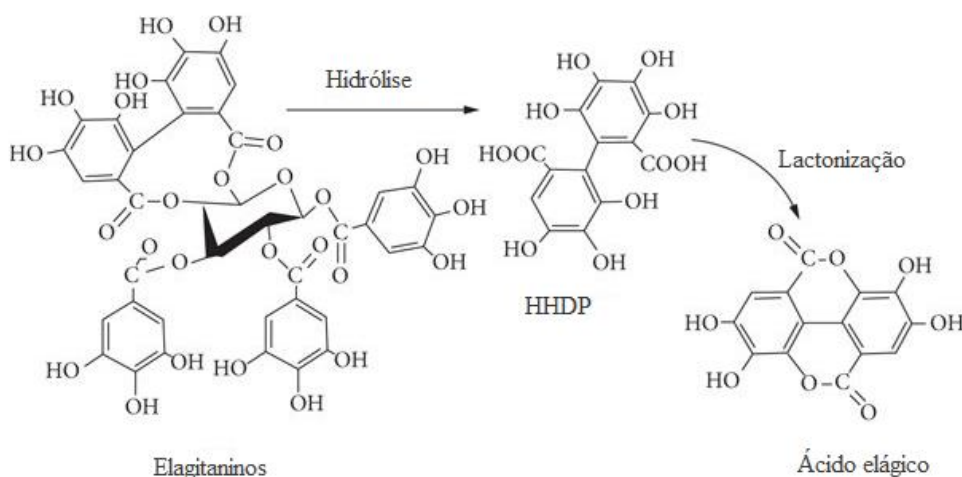


Figura 1: Formação do ácido elágico. Adaptado (Sharifi-Rad *et al.*, 2022)

A estrutura química do AE é composta por uma porção hidrofílica contendo quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona, além de uma porção lipofílica que contém dois anéis bifenílicos (**Figura 1**). Essa estrutura específica permite que o AE possua sítios capazes de aceitar elétrons e doar ligações de hidrogênio na lactona e nos grupos hidroxila, respectivamente (Alfei *et al.*, 2020). Essas propriedades estruturais fundamentais desempenham um papel crucial na sua interação com alvos biológicos e, conseqüentemente, nos efeitos observados em processos como a regulação da inflamação e a proteção contra danos oxidativos (Sharifi-Rad *et al.*, 2022).

Devido à natureza fracamente ácida de seus quatro grupos fenólicos, próximos ao pH neutro, ocorre a desprotonação destes grupos, enquanto em pH acima de 9,6, os anéis lactona se abrem, formando um derivado carboxila. Além disso, o AE exibe baixa solubilidade em água, mas essa solubilidade é potencializada com o aumento do pH. Em soluções de solventes orgânicos, o AE é levemente solúvel em metanol, mais solúvel em etanol e dimetilsulfóxido (DMSO), e apresenta solubilidade máxima em N-metil-2-pirrolidona (NMP), evidenciando o efeito do pH básico na dissolução do AE (Zuccarl *et al.*, 2020).

A maioria dos atributos farmacológicos do AE dependem de sua atividade antioxidante, a qual é predominantemente determinada por sua estrutura básica contendo quatro grupos hidroxila e duas lactonas (Alfei *et al.*, 2020). Tanto os grupos hidroxila quanto os grupos lactona não apenas formam ligações de hidrogênio, mas também possuem a capacidade de atuar como doadores e receptores de elétrons. Consequentemente, o AE funciona como um potente antioxidante devido à sua capacidade de aceitar elétrons de diferentes substratos e à sua habilidade de participar de reações redox, resultando na eliminação de radicais livres (Evtyugin *et al.*, 2020). Além disso, estudos sugerem que o AE pode exercer efeitos benéficos na redução da neuroinflamação. Dentre os mecanismos propostos para esses efeitos incluem a modulação de vias de sinalização inflamatória, a inibição da ativação de células gliais e a redução da produção de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e ERO e ERN (Alfei *et al.*, 2020).

De acordo com um estudo conduzido por Dorneles *et al.* (2020), utilizando ratos Wistar machos submetidos a injeções intraperitoneais de LPS durante 8 dias, seguidas de administração oral de 100 mg/kg de AE duas horas após cada injeção, os resultados revelaram que o tratamento com AE no grupo exposto ao LPS foi capaz de modular a resposta do sistema imunológico, reduzindo significativamente a expressão de GFAP, atenuando o dano oxidativo com consequente melhora no sistema antioxidante, além de prevenir o aumento da atividade da acetilcolinesterase. Assim, foram demonstrados os efeitos neuroprotetores da AE e seu potencial terapêutico relacionados à neuroinflamação e estresse oxidativo.

Os efeitos promissores do AE na modulação da resposta inflamatória e na redução do estresse oxidativo têm sido evidenciados. Através da redução significativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da atenuação dos danos oxidativos, o AE demonstrou seu potencial como agente anti-inflamatório e antioxidante em células gliais. Estes achados destacam a importância do AE como uma estratégia terapêutica viável para condições neuroinflamatórias, sugerindo sua capacidade de proteger os astrócitos e, por conseguinte, SNC. Entretanto, pesquisas futuras são necessárias para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos e para explorar seu potencial em estudos utilizando modelos animais.

4 MANUSCRITO

Os resultados contidos nesta dissertação estão apresentados em formato de manuscrito. Os elementos materiais e métodos, resultados, discussão e referências seguem a estrutura conforme as normas da revista à qual foi submetido: **Molecular and Cellular Biochemistry**.

Ellagic acid prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage and inflammatory responses in astrocytes

Thais Marini da Rosa^a, Larissa Menezes da Silveira^a, Natália Pontes Bona^a,
Juliane Torchelsen Saraiva^b, Júlia Araújo da Silva^b, William Borges
Domingues^c, Lucas Petitemberte de Souza^c, Mariana Cavalcante Nascimento^c,
Vinicius Farias Campos^{a,c}, Francieli Moro Stefanello^b, Cinthia Melazzo de
Andrade^d, Nathalia Stark Pedra^a, Roselia Maria Spanevello^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão s/n, Pelotas-RS, CEP 96010-900, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n, Pelotas-RS, CEP 96010-900, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Cidade Universitária, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil

* Corresponding authors

Roselia Maria Spanevello – Email: rspanevello@gmail.com

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/Bioquímica, Prédio 29, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 9601090, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brazil

Phone: +55 53 32757355

Abstract

Neuroinflammation is a complex process characterized by activating glial cells such as microglia and astrocytes in response to pathological stimuli. Astrocyte activation is marked by overexpression of pro-inflammatory cytokines, coupled with increased oxidative stress. Considering that astrocytes are important mediators of neuroinflammation, compounds that interfere with astrocytic mechanisms represent promising therapeutic targets. Ellagic acid (EA) is a phenolic compound found in various plant sources. It has garnered attention for its antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of EA in astrocytes exposed to lipopolysaccharide (LPS). Astrocytes were exposed to LPS and treated with different concentrations of EA (50, 100, and 200 μ M) for 48 hours. Viability and cellular proliferation, oxidative stress parameters, and gene expression of inflammatory markers were evaluated. LPS decreased astrocytic viability and increased cell proliferation. Treatment with EA was capable of preventing these changes. EA also prevented the increase in reactive oxygen and nitrogen species levels and the decrease in antioxidant enzyme activities induced by LPS in astrocyte. LPS induced an increase in gene expression of IL-1 β and TNF- α and EA in the concentration of 100 μ M was capable to prevent this alterations. On the other hand, EA increased gene expression of IL-6 and GSK3-B when compared to cells exposed only to LPS. In conclusion, this study highlights the therapeutic potential of EA as a modulator of astrocytic mechanisms, enhancing our understanding of neuroprotection and paving the way for further research into its mechanisms and clinical applications in neuroinflammatory disease.

Keywords: ellagic acid; neuroinflammation; oxidative stress; astrocytes; lipopolysaccharide

1. Introduction

Ellagic acid (EA) is a phenolic compound found in various plant sources, including fruits such as pomegranates, strawberries, and raspberries, as well as certain herbs and seeds [1]. Its chemical structure comprises a hydrophilic portion containing four hydroxyl groups and two lactone groups, complemented by a lipophilic portion with two biphenyl rings [2]. In the last years, EA has garnered notable interest owing to its diverse pharmacological effects as extensive range of molecular targets [1]. Previous studies have highlighted the pivotal roles of its antioxidant and anti-inflammatory properties in contributing to its broad-spectrum pharmacological profile [3,4]. Therefore, exploring the effects of AE in mechanisms associated with neuroinflammation may provide crucial insights for the development of novel therapeutic approaches for CNS diseases.

Neuroinflammation is a multifaceted process marked by the activation of glial cells in response to pathological stimuli such as injury, infection, or trauma, within the nervous system [5]. Chronic neuroinflammation is recognized as a significant contributor to the progression and development of various neurological diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis [6]. This process is orchestrated through the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), as well as reactive oxygen and nitrogen species by resident CNS cells like microglia and astrocytes [5,7].

Astrocytes play multifaceted crucial roles in maintaining brain health and function [8,9]. These glial cells have essential functions such as maintenance of redox potential, metabolic support to neurons, and regulation of the extracellular environment, including ion balance and regulation of neurotransmitter levels [10]. Furthermore, astrocytes actively participate in immune responses within the CNS. Astrocyte reactivity is a hallmark of neuroinflammation and is characterized by cellular hypertrophy and the upregulation of glial fibrillary protein (GFAP), an intermediate filament protein [10,11]. Chronic astrogliosis can result in the sustained production of oxygen and nitrogen reative species and the release of proinflammatory molecules such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α [11,12]. In this context, astrocytes have the capacity to amplify or resolve neuroinflammatory

responses, depending on the context and duration of the insult [10, 12]. Consequently, comprehending the intricate roles of astrocytes in neuroinflammation mechanisms may provide potential avenues for innovative therapeutic advancements.

Lipopolysaccharide (LPS) is a well-known endotoxin derived from gram-negative bacteria. It is commonly employed as a potent pro-inflammatory agent to induce inflammatory conditions in both *in vivo* and *in vivo* studies within the field of neuroscience [13-16]. Previous studies have demonstrated that LPS induces alterations in cell viability, oxidative damage, and the release of inflammatory mediators in astrocytes [15,16]. Consequently, LPS serves as a valuable research tool for investigating the neuroprotective activities of natural compound in astrocytes - mediated mechanisms involved in neuroinflammation. Thus, the aim of this study was investigated the effects of EA in mitigating inflammatory responses and oxidative stress in primary cultures of astrocytes exposed to LPS.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

LPS from *Escherichia coli* (055: B5), ellagic acid (EA), 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethane sulfonic acid (HEPES), sodium bicarbonate (NaHCO₃), 3(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), sulforhodamine B (SRB), coomassie brilliant blue G, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid (TCA) and hydrogen peroxide were purchased from Synth® in Brazil. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fungizone, penicillin/streptomycin, 0.5% trypsin/ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) solution, and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco in Carlsbad, CA, USA. All other reagents used in the experiments were of analytical grade and highest purity available.

2.2 Animals

All animal procedures were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil under protocol number CEEA 027159/2022-4, and were conducted in accordance the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DCBA 2013) and the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.3 Astrocytes culture

Astrocytes primary culture was prepared as previously described [16]. Newborn rats were euthanized, their brains were removed, and the cerebral cortex was separated and mechanically dissociated with a balanced salt solution free of calcium and magnesium (pH 7.4) to form a cell suspension. The resulting cell suspension was centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and the pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS (pH 7.6). The cells were seeded in 6 and 96-well plates pretreated with poly-L-lysine. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 20 days until confluence for cell maturation and differentiation, with the medium being changed every 4 days.

2.4 Treatment with LPS and EA

The primary astrocyte cultures were initially exposed to AE at different concentrations (50, 100, and 200 µM) for 48 hours. Subsequently, cells were exposed to 1 µg/mL LPS for 3 hours (**Figure 1**). EA was prepared in DMSO and used at final concentrations of 50, 100, and 200 µM. The percentage of DMSO per ml of medium remained below 1%. Control cells were maintained only in DMEM with 10% FBS. The experimental protocol and the duration of exposure to LPS were consistent with previous studies from research group conducted on astrocytes culture [15,16].

2.5 Cell viability

Cell viability was determined using the MTT assay, which consists of measuring the number of cells with metabolically active mitochondria based on the reduction of the tetrazolium salt MTT to formazan [17]. The cultures were washed with CMF and then incubated with MTT solution (0.5 mg/mL per well) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 90 min. After, the medium was removed, and formazan crystals were diluted in DMSO. Finally, optical density (OD) was measured at 492 nm using a microplate reader. Results were calculated using Prism 8.0 software (Prism GraphPad Software, San Diego, USA) and expressed as the percentage of control using the following formula: Cell viability rate (%) = (OD of treated cells/OD of control) × 100%.

2.6 Cell biomass

The SRB assay was used for the determination of cell proliferation based on the measurement of cell protein [18]. Initially, cultures were washed and fixed in 50% TCA for 45 min at 4 °C. After this period, five washes were performed with distilled water. Subsequently, 0.4% SRB was added and incubated in the dark at room temperature for 30 min. Afterward, the cells were washed five times with 1% acetic acid for complete removal of non-complexed dye with proteins, and SRB was eluted with 10 mM Tris. OD was measured at 530 nm using a microplate reader, and this value was calculated using Prism 8.0 software (Prism GraphPad Software, San Diego, USA) according to the following formula: Cell proliferation rate (%) = (OD of treated cells/OD of control) × 100%.

2.7 Oxidative stress analysis

After 48 h of treatment, cultures were washed twice with sterile water, and the lysate was manually prepared with the aid of a cell scraper. Then, the supernatant was centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The pellet was discarded, and the supernatant was used for oxidative parameters analysis. Protein quantification was conducted using the method previously described using bovine serum albumin as the standard [19].

2.7.1 Reactive oxygen species (ROS) assay

The ROS levels were evaluated according to methods previously described with some modifications [16,20]. This method is based on the reaction of 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), with intracellular ROS to generate a fluorescence intermediate. Intact cells were incubated with 1 μ M DCFH-DA for 30 min at 37 °C. After incubation, cells were washed with PBS, and the fluorescence intensity was measured using a multi-well plate reader (485/520 nm). The ROS production was reported as the percentage of untreated cells (control).

2.7.2 Nitrite levels assay

The levels of nitrite was evaluated in cells supernatants according to the method of Stuehr and Nathan [21], utilizing a colorimetric reaction with Griess reagent. Initially, 5% sulfanilamide in phosphoric acid was added to the cell culture supernatants. The mixture was then incubated at room temperature for 10 minutes. Subsequently, Griess reagent (0.1% N-[1-naphthyl] ethylenediamine dihydrochloride) was added to the samples and incubated for an additional 10 minutes in the dark. The absorbance was measured at 540 nm, and the levels of nitrite were determine using a standard curve of sodium nitrate.

2.7.3 Total sulfhydryl (SH) levels assay

The total SH content was determined in astrocyte lysates employing the DTNB method, following the protocol outlined by Aksenov and Markesbery [22]. This assay relies on the reduction of 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, resulting in the generation of a yellow derivative (2-nitro-5-thiobenzoic acid) (TNB). In brief, the samples were added to PBS buffer containing EDTA (pH 7.4), and the reaction was initiated by the addition of DTNB. The absorbance was measured using a microplate reader at 412 nm. Results The results are expressed in nmol TNB/mg of protein.

2.7.4 Superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was analyzed in cells lysades as according to the method of Misra and Fridovich [23]. This method is based on the inhibition of adrenaline auto-oxidation through the elimination of superoxide anions by SOD. The SOD activity was measured in a microplate reader at 480 nm. SOD activity was reported as units/mg of protein.

2.7.5 Catalase (CAT) activity

The CAT activity was measured using a method previously described [24]. This method is based on the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) in potassium phosphate buffer (pH 7.0) and was monitored using a microplate reader at 240 nm absorbance. The CAT activity was reported as units/mg of protein.

2.7.6 Glutathione - S- Transferase (GST) activity

The GST activity was assessed following the method described by Habig et al. [25]. This method employs 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The reaction mixture contains 1 mM CDNB diluted in ethanol, 10 mM glutathione (GSH), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), and 20 μ L cell lysate. To measure the GST was quantified and expressed as μ mol GS-DNB min/mg protein.

2.8 RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real-time polymerase chain reaction for IL-1 β , IL-6, TNF- α and GSK3- β

Total mRNA was extracted from astrocytes cells using TRIzol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) followed by DNase treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, Carlsbad, USA) in order to ensure minimum DNA contamination of the samples. The total RNA isolated was quantified and its purity (260/280 and 260/230 ratios) was examined by spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA).

The cDNA synthesis was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems™, UK) according to the manufacturer's

protocol. For reverse transcription, 500 ng of total RNA was used in a reaction volume of 20 μ l. The amplification was made with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) using the QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher, USA) and the sequence of primers used are indicated in **Table I** [26-30]. The qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C to activate the hot-start Taq polymerase, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 95°C, primer annealing for 60 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C (fluorescence signals were detected at the end of every cycle). Baseline and threshold values were automatically set by the QuantStudio Design Analysis software.

The number of PCR cycles required to reach the fluorescence threshold in each sample was defined as the Ct value, and each sample was analyzed in duplicate to obtain an average Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to normalize the fold change in gene expressions [31], using β -actin as housekeeping gene.

2.9 Statistical Analysis

The statistical significance of differences between groups was determined by one-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). The results were reported as the mean values for each set of data $\pm$ SEM, and the degree of statistical significance in all analyses was defined at a probability level of $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 EA prevents LPS-induced damage to astrocytic viability and proliferation

The results demonstrated that exposure to LPS caused a significant decrease in astrocytic viability compared to the control group cells ($P < 0.05$). On the other hand, EA treatment at all concentrations showed a statistically significant increase in cell viability compared to the LPS-exposed group ($P < 0.05$) (Figure 2A). Furthermore, exposure to LPS increased cell proliferation after 48

hours ($P<0.0001$), a phenomenon mitigated by EA administration, particularly evident at a concentration of 200 μM ($P<0.0001$), reestablishing cellular homeostasis (Figure 2B). Thus, the results of our prevention protocol demonstrate the protective capacity of EA against LPS-induced astrocytic impairment.

3.2 EA prevents oxidative damage caused by LPS

Following exposure of astrocytes to LPS, our findings revealed a significant increase in ROS ($P<0.0001$) and nitrite levels ($P<0.01$), along with a decline in SH content ($P<0.0001$) in astrocytes after a 3-hour incubation period, in contrast to the control group (**Figure 3**). However, EA treatment led to a statistically significant mitigation in ROS and nitrite levels at the two highest concentrations ($P<0.01$ and $P<0.05$ for AE 100 μM , and $P<0.001$ and $P<0.01$ for AE 200 μM , respectively). Furthermore, EA significantly increased SH levels at the concentrations of 100 ($P<0.001$) and 200 μM ($P<0.0001$) compared to the LPS-exposed group after 48 hours of treatment (**Figure 3**).

3.3 Effect of EA on antioxidant enzyme activity in astrocytes exposed to LPS

The findings regarding the activities of antioxidant enzymes are showed in Figure 4. Initially, a significant decrease in the activity of SOD ($P<0.0001$), CAT ($P<0.0001$), and GST ($P<0.0001$) enzymes in astrocytes exposed to LPS was observed. However, EA treatment attenuated these changes. Specifically, concerning the SOD and CAT enzymes, treatment with AE at the two highest concentrations (100 and 200 μM) resulted in increased in enzymatic activity ($P<0.0001$) compared to the group exposed to LPS. Furthermore, a significant increase in GSH activity in astrocytes was observed at all treatment concentrations ($P<0.001$, $P<0.0001$, and $P<0.0001$ for AE 50, 100, and 200 μM , respectively) compared to the group exposed to LPS.

3.4 Effect of EA on TNF- α , IL-1 β , IL-6, and GSK3- β gene expression in astrocytes exposed to LPS

To investigate the role of EA on inflammation-related pathways the relative mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and GSK3- β were evaluated in cultures exposed to EA for 48 hours (**Figure 5**). The relative mRNA expression of all genes was increased in astrocytes cultures exposed to LPS compared to untreated cells ($P < 0.0001$). However, treatment with EA (100 μ M) efficiently prevent the increase in gene expression of TNF- α and IL-1 β induced by LPS ($P < 0.0001$) (**Figure 5 A and B**). On the other hand, EA significantly increased the relative expression of IL-6 and GSK3-B genes compared to cells exposed to LPS ($P < 0.0001$) (**Figure 5 C and D**).

4. Discussion

In the present study, we evaluated the preventive effect of EA in a model of neuroinflammation induced by LPS in primary cultures of astrocytes. Consistent with previous studies [15,16,32] exposure to LPS resulted in significant changes in astrocytes viability and biomass, accompanied by oxidative stress and alterations in pro-inflammatory markers.

LPS effects are mediated by the activation of Toll-like 4 (TLR4) receptors located on the cell membrane of astrocytes [33]. This receptor can recognize LPS as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP), and after activation by LPS, astrocytic TLR4 initiates an intracellular signaling cascade, leading to a significant increase in the expression of apoptotic factors, autophagy-related components, and several inflammatory mediators, including IL-1, IL-6, and TNF- α [34,35]. Furthermore, oxidative damage is exacerbated by mitochondrial dysfunction with increased levels reactive oxygen and nitrogen species contributing to the amplification of the inflammatory response [36].

In our present study, we observed that EA effectively mitigated the alterations induced by LPS in cell viability and biomass in primary astrocyte cultures. Moreover, EA treatment inhibited ROS and nitrite production and increased the activity of antioxidant enzymes contributing to the maintenance of status redox in astrocytes. Corroborating with our results, other studies have also demonstrated the AE potential in preventing oxidative damage induced by

cadmium in astrocytes [37], the exacerbated production of nitrites induced by LPS in macrophages [38] and alleviating the mitochondrial dysfunction and oxidative damage in cardiomyocytes exposed to clozapine [39].

EA is comprised of two lactone groups and four hydroxyl groups, rendering it effective in neutralizing a broad spectrum of reactive oxygen and nitrogen species [40, 41]. The antioxidant capacity of EA can be attributed to its ability to scavenge free radicals such as hydroxyl radicals and peroxynitrite [40,41]. Additionally, its capacity for metal chelation also contributes to the reduction of free radicals production, thus providing protection against oxidative stress [40]. In the present study, we also demonstrated that EA caused an upregulation in the activities of key antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and GST. These results are consistent with others studies in the literature where EA administration has been shown to positively influence the activity of SOD and CAT enzymes in a preclinical model of Parkinson's disease [42], and also to increase GST levels in the livers of rats [43]. Taken together, these different mechanisms involved in the antioxidant action of EA can explain the decrease in levels of ROS and nitrites observed in astrocytes exposed to LPS.

The antioxidant capacity of EA can be also explain by its ability to regulate the activity and expression of antioxidant genes. A pivotal player in this process is the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a redox status-sensitive transcription factor, crucial for the control to antioxidant response [44]. Increasing studies highlight the potential of EA in reducing oxidative damage in different preclinical models through modulation of the Nrf2 pathway [45, 46]. In oxidative stress conditions, Nrf2 translocates to the cell nucleus, where it binds to DNA, triggering the transcription of genes associated with antioxidant defense system [44]. This mechanism induces an increase of the expression and activity of SOD, CAT, and GST enzymes [47]. SOD and CAT enzymes play a crucial role in neutralizing ROS such as superoxide anion and hydrogen peroxide. SOD catalyzes the conversion of superoxide anion into hydrogen peroxide and oxygen, while CAT converts hydrogen peroxide into water and oxygen [47]. Based on this, it is plausible to suggest that activation of Nrf2 pathway in astrocytes may be involved in the antioxidant effect of EA observed in this study.

Indeed, alterations in redox balance have been consistently associated with LPS-triggered inflammatory processes [48]. This imbalance between levels of reactive species and antioxidant defense systems can lead to the oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids, triggering a cascade of exacerbated inflammatory events in astrocytes [49]. Furthermore, the activation of redox-sensitive signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) plays a crucial role in amplifying the inflammatory response induced by LPS, leading to increased expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and other inflammatory mediators [50]. Corroborating with these findings, we observed a significant increase in inflammatory markers such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and GSK3- β in astrocytes exposed to LPS.

In this study, EA effectively prevented the increase in the mRNA relative expression of TNF- α and IL-1 β induced by LPS. Previous studies have shown that EA inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines by blocking the NF- κ B pathway [51]. When astrocytes are exposed to pathogenic stimuli such as LPS, NF- κ B is activated, and its nuclear translocation induces the transcription of genes related to inflammation, leading to the production of inflammatory mediators such as the cytokines IL-1 β and TNF- α [51]. EA can inhibit the activation of NF- κ B at different phases of the inflammatory process. It can prevent the phosphorylation and subsequent degradation of the inhibitor of κ B (I κ B), which normally keeps NF- κ B inactive in the cytoplasm. Furthermore, EA interferes with the translocation of NF- κ B to the nucleus and its binding to the promoter elements of pro-inflammatory genes, thus preventing the transcription of IL-1 β and TNF- α [51, 52, 53].

On the other hand, EA positively regulated the gene expression of GSK3- β and IL-6. Interestingly, literature data suggest that GSK3- β enzyme stimulates the production of several pro-inflammatory cytokines through the modulation of toll-like receptors [54]. According to Beurel and Joze [55], the production of IL-6 by glial cells is strongly dependent on GSK3- β . Furthermore, evidence suggests that upregulation of GSK3- β stimulates the activation of members of the signal transducers and activators of transcription (STAT) family of transcription factors, mainly STAT3, whose neuroprotective function involves the secretion of IL-6.

Thus, elevated expression of GSK3- β and STAT3 appears to be sufficient to stimulate IL-6 production in glial cells such as astrocytes [55].

Although chronic expression of IL-6 in pathological conditions triggers deleterious effects, it is important to consider that increased expression of this cytokine may also contribute to the release of neurotrophic factors by astrocytes, suggesting a possible neuroprotective and anti-inflammatory effect of IL-6 [56]. This could to explain, at least in part, the potential of EA to significantly reduce the expression of the inflammatory genes TNF- α and IL-1 β preventing cytotoxicity and oxidative damage triggered by LPS. Increasing evidence highlights that the anti-inflammatory role of IL-6 is directly related to the inhibition of TNF- α synthesis, the reduction of cell death, and the development of oxidative stress by astrocytes [56, 57, 58].

Interestingly, in several experimental models, the neuroprotective role of IL-6 has frequently been linked to the activation of STAT3, whose antioxidant potential is mediated by the reduction of ROS production and the upregulation of Nrf-2 and SOD expression [59,60,61]. These findings suggest a complex interconnection between EA, inflammatory signaling pathways, and antioxidant mechanisms, which may play a crucial role in modulating the astrocytes response in neuroinflammation conditions.

In conclusion, our results showed that LPS caused cytotoxicity, oxidative damage and, upregulated the expression of in pro-inflammatory genes in astrocytes culture. The antioxidant and anti-inflammatory properties of AE can modulate mechanisms in astrocytes associated with neuroinflammation (Figure 6). However, further studies are necessary to understand the mechanisms by which EA influences astrocytic responses, providing valuable insights for the development of therapeutic interventions aimed at treating a variety of diseases associated with neuroinflammation.

References

1. Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H, Polishchuk A, Lysiuk R, Oliinyk P, De Mais L, Bontempo P, Martorell M, Daştan SD, Rigano D, Wink M, Cho WC (2022) Ellagic Acid: a review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev* 21:3848084 [https://doi.org/ 10.1155/2022/3848084](https://doi.org/10.1155/2022/3848084)

2. Yamada H, Wakamori S, Hirokane T, Ikeuchi K, Matsumoto S (2018) Structural revisions in natural ellagitannins. *Molecules* 23:1901. [https://doi.org/ 10.3390/molecules23081901](https://doi.org/10.3390/molecules23081901).

3. Bains M, Kaur J, Akhtar A, Kuhad A, Sah, SP (2022) Anti-inflammatory effects of ellagic acid and vanillic acid against quinolinic acid-induced rat model of Huntington's disease by targeting IKK-NF- κ B pathway. *Eur J Pharmacol* 934: 175316. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175316>

4. Gupta A, Singh AK, Kumar R, Jamieson S, Pandey AK, Bishayee A (2021) Neuroprotective potential of ellagic acid: a critical review. *Adv Nutr* 12: 1211-1238. [https://doi.org/ 10.1093/advances/nmab007](https://doi.org/10.1093/advances/nmab007)

5. Kwon HS, Koh S (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 26: 42. [https://doi.org/ 10.1186/s40035-020-00221-2](https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2)

6. Teleanu D, Niculescu AG, Lungu I, Radu C, Vladâcenco O, Roza E, Costăchescu B, Grumezescu AM, Teleanu RI (2022) An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *Int J Mol* 23:5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>

7. Patani R, Hardingham GE, Liddelow AS (2023) Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Rev Neurol* 19: 395-409. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1>

8. Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ (2022) Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discov* 21:339-358. [https://doi.org/ 10.1038/s41573-022-00390-x](https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x)

9. Tan R, Hong R, Sui C, Yang D, Tian H, Zhu T, Yang Y (2023) The role and potential therapeutic targets of astrocytes in central nervous system demyelinating diseases. *Front Cell Neurosci* 17:1233762. [https://doi.org/ doi: 10.3389/fncel.2023.1233762](https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1233762)

10. Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M (2010) Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39:115-123. doi: <https://doi.org/10.1177/0192623310385254>.

11. Li X, Li M, Tian L, Chen J, Liu R, Ning B (2020). Reactive Astrogliosis: implications in spinal cord injury progression and therapy. *Oxid Med Cell Longev* 19: 9494352. <https://doi.org/10.1155/2020/9494352>

12. Bhusal A, Afridi R, Lee WH, Suk K (2023) Bidirectional Communication Between Microglia and Astrocytes in Neuroinflammation *Curr Neuropharmacol* 21: 2020-2029. <https://doi.org/10.2174/1570159X21666221129121715>

13. Dornelles GL, De Oliveira, JS, De Almeida EJR, Mello CBE, Rodrigues BR, Da Silva CB, Petry LDS, Pillat MM, Palma TV, De Andrade CM (2020) Ellagic acid inhibits neuroinflammation and cognitive impairment induced by lipopolysaccharides. *Neurochem Res* 45: 2456-2473. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03105-z>

14. Vizuite A, Fróes F, Seady M, Zanutto C, Bobermin L, Roginsk A, Wajner M, Quincozes-Santos A, Gonçalves C (2022) Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. *J Neuroinflammation* 19: 255. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02612-w>

15. Pacheco SM, Azambuja JH, De Carvalho TR, Soares MSP, Oliveira PS, Da Silveira EF, Stefanello FM, Braganhol E, Gutierrez JM, Spanevello RM (2018). Glioprotective effects of lingonberry extract against altered cellular viability, acetylcholinesterase activity, and oxidative stress in lipopolysaccharide-treated astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 38: 1107-1121. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0581-x>.

16. Alvez FL, Bona NP, Pedra NS, Da Silva, DS, Cunico WJ, Stefanello FM, De Andrade CM, Soares, MSP, Spanevello, RM (2023) Effect of thiazolidin-4-one against lipopolysaccharide-induced oxidative damage, and alterations in adenine nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in cultured astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 43: 283-297. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01177-1>

17. Mosmann. T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

18. Pauwels B, Korst AE, De Pooter C, Pattyn G, Lambrechts H, Baay M, Lardon F, Vermorken J (2003) Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 221-2266. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0557-9>

19. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.

20. Pedra NS, Bona NP, De Aguiar M, Spohr L, Alvez F, Santos F, Saraiva J, Stefanello F, Braganhol E, Spanevello RM (2022) Impact of gallic acid on tumor suppression: Modulation of redox homeostasis and purinergic response in in vitro and a preclinical glioblastoma model. *J Nutr Biochem* 110: 109156. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109156>

21. Stuehr D, Nathan C (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:

1543-1555. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>

22. Aksenov MY, Markesbery WR (2021) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6)

23. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175.

24. Aebi, H (1984) Oxygen radicals in biological systems - catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.

25. Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.

26. Solgi T, Amiri I, Asl S, Saidijam M, Seresht B, Artimani T (2021) Antiapoptotic and antioxidative effects of cerium oxide nanoparticles on the testicular tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: An experimental study. *Int J Reprod Biomed* 19: 589-598. <https://doi.org/10.1016/0.18502/ijrm.v19i7.9465>

27. Dupuis J, Sirois M, Rhéaume E, Nguyen Q, Clavet-Lanthier M, Brand G, Mihalache-Avram T, Théberge-Julien G, Charpentier D, Rhainds D, Neagoe P, Tardif J (2020) Colchicine reduces lung injury in experimental acute respiratory distress syndrome. *PLoS One*. 15: e0242318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242318>

28. Aires I, Ribeiro-Rodrigues T, Boia R, Catarino S, Girão H, Ambrósio A, Santiago A (2020) Exosomes derived from microglia exposed to elevated pressure amplify the neuroinflammatory response in retinal cells. *Glia* 68:2705-2724. <https://doi.org/10.1002/glia.23880>

29. Jiang H, Liu J, Fan C, Wang J, Li W (2021) lncRNAS56464.1 as a ceRNA promotes the proliferation of fibroblast-like synoviocytes in experimental arthritis via the Wnt signaling pathway and sponges miR-152-3p. *Int J Mol Med* 47: 17. [https://doi.org/ 10.3892/ijmm.2021.4850](https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4850)

30. Cai L, Tu L, Li T, Yang X, Ren Y, Gu R, Zhang Q, Yao H, Qu X, Wang Q, Tian J (2020) Up-regulation of microRNA-375 ameliorates the damage of dopaminergic neurons, reduces oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease by inhibiting SP1. *Aging* 12: 672-689. <https://doi.org/10.18632/aging.102649>

31. Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method *Methods* 25: 402-408 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

32. Fachel F, Dal P, Azambuja J, Endres M, Bassani V, Koester L, Henriques A, Barschak A, Teixeira F, Braganhol E (2020) Glioprotective effect of chitosan-coated rosmarinic acid nanoemulsions against lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in rat astrocyte primary cultures. *Cell Mol Neurobiol* 40: 123-139. [https://doi.org/ 10.1007/s10571-019-00727-y](https://doi.org/10.1007/s10571-019-00727-y)

33. Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas A (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*. 59:242-55. [https://doi.org/ 10.1002/glia.21094](https://doi.org/10.1002/glia.21094).

34. Li L, Acioglu C, Heary R, Elkabes S (2021) Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun* 91: 740-755. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.007>

35. Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K (2022) Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future

directions for its use. *Molecules* 27:5481.
<https://doi.org/10.3390/molecules27175481>

36. Geyer S, Jacob M, Hsu NJ (2019) Immunity against bacterial infection of the central nervous system: an astrocyte perspective. *Front Mol Neurosci* 12: 57. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00057>

37. Yang C, Tzou B, Liu Y, Tsai M, Shyue S, Tzeng S (2008) Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *J Cell Biochem* 103: 825-834. <https://doi.org/10.1002/jcb.21452>

38. BenSaad L, Kim K, Quah C, Kim W, Shahimi M (2017) Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Altern Med* 14: 47. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>

39. Ahangari R, Khezri S, Jahedsani A, Bakhshii S, Salimi A (2022) Ellagic acid alleviates clozapine-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes. *Drug Chem Toxicol* 45: 1625-1633. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1850758>

40. Galano A, Francisco Marquez M, Pérez-González A (2014) Ellagic acid: an unusually versatile protector against oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 25: 904-18. <https://doi.org/10.1021/tx500065y>

41. Priyadarsini K, Khopde S, Kumar S, Mohan H (2022) Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 50: 2200-2026. <https://doi.org/10.1021/jf011275g>

42. Ardah M, Bharathan G, Kitada T, Haque M (2020) Ellagic Acid Prevents Dopamine Neuron Degeneration from Oxidative Stress and Neuroinflammation

in MPTP Model of Parkinson's Disease. *Biomolecules* 10:519. <https://doi.org/10.3390/biom10111519>

43. Shepherd AG, Manson M, Ball H, McLellan L (2020) Regulation of rat glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) subunits by chemopreventive agents and in aflatoxin B(1)-induced preneoplasia. *Carcinogenesis* 21: 1827-34. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.10.1827>

44. Kume T (2017) Therapeutic Potential of the Activators of the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2-Antioxidant Response Element Pathway in Brain Disorders. *Biol Pharm Bull* 40: 53-556. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00091>

45. Ding Y, Zhang B, Zhou K, Chen M, Wang M, Jia Y, Song Y, Li Y, Wen A (2014) Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation. *Int J Cardiol* 20: 508-514. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.045>

46. Xiao Y, Huang R, Wang N, Deng Y, Tan B, Yin Y, Qi M, Wang J (2022) Ellagic Acid Alleviates Oxidative Stress by Mediating Nrf2 Signaling Pathways and Protects against Paraquat-Induced Intestinal Injury in Piglets. *Antioxidants (Basel)*. 27: 52. <https://doi.org/10.3390/antiox11020252>

47. Ríos J, Giner R, Marín M, Recio M (2018) A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med* 84: 1068-1093. <https://doi.org/10.1055/a-0633-9492>

48. Noworyta-Sokołowska K, Górská A, Gołembiowska K (2013) LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol Rep* 65: 863-869. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71067-3](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71067-3)

49. Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri S, Pramodh S, Alsulimani, A, Alkhananm M, Harakeh S, Hussain A, Haque S, Reshi M (2022) Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. *Cells* 11: 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>

50. Lai J, Liu Y, Liu C, Qi MP, Liu RN, Zhu XF, Zhou QG, Chen YY, Guo AZ, Hu CM, (2017) Indirubin inhibits lps-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF-kB and MAPK signaling pathways. 40: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0447-7>

[51] Zhu H, Yan Y, Jiang Y, Meng X (2022) Ellagic acid and its anti-aging effects on central nervous system. *Int J Mol Sci* 23:10937. <https://doi.org/10.3390/ijms231810937>

[52] Aslan A, Gok O, Beyaz S, Arslan E, Erman O, Ağca CA (2020) The preventive effect of ellagic acid on brain damage in rats via regulating of Nrf-2, NF-kB and apoptotic pathway. *J Food Biochem* 44:e13217. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13217>

[53] Aslan A, Beyaz S, Gok O, Can MI, Erman F, Erman O (2021) The impact of ellagic acid on some apoptotic gene expressions: a new perspective for the regulation of pancreatic Nrf-2/NF-kB and Akt/VEGF signaling in CCl4-induced pancreas damage in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 43:145-152. <https://doi.org/10.1080/08923973.2020.1869255>

[54] Martin M, Rehani K, Jope R, Michalek S (2005). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6: 777-784. <https://doi.org/10.1038/ni1221>

[55] Beurel E, Jope R (2009) Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflammation* 11: 6. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-9>

[56] Kossmann T, Hans V, Imhof H, Trentz O, Morganti-Kossmann M (1996). Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes. *Brain Res* 25: 143-152. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01501-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01501-9)

- [57] Quintana A, Molinero A, Borup R, Nielsen F, Campbell I, Penkowa M, Hidalgo J (2008). Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome. *Dev Neurobiol* 68: 195-208. [https://doi.org/ 10.1002/dneu.20584](https://doi.org/10.1002/dneu.20584)
- [58] Kummer K, Zeidler M, Kalpachidou T, Kress M (2021) Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. *Cytokine* 144: 155582. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155582>
- [59] Jung J, Kim G, Narasimhan P, Song Y, Chan P (2009) Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29: 7003-70014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1110-09.200>
- [60] Szczepanek K, Chen Q, Derecka M, Salloum F, Zhang Q, Szelag M, Cichy J, Kukreja R, Dulak J, Lesniewsky EJ, Larner AC (2011) Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 286: 29610-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226209>
- [61] Akabawy G, Aldera H, Al-Farga AM (2021) Quercetin protects against experimentally-induced myocardial infarction in rats by an antioxidant potential and concomitant activation of signal transducer and activator of transcription 3. *J Physiol Pharmacol* 71. [https://doi.org/ 10.26402/jpp.2020.6.11](https://doi.org/10.26402/jpp.2020.6.11).

Table 1 - Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction. Listed are the forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene and the β -actin endogenous control.

Primer Name	Sequence	Reference
β -actin Forward	5' ACCCGCGAGTACAACCTTCT 3'	Solgi et al. [26]
β -actin Reverse	5' ATACCCACCATCACACCCTGG 3'	
IL-6 Forward	5' TGAAGAACAACCTTACAAGATAAC 3'	Dupius et al. [27]
IL-6 Reverse	5' CATTAGGAGAGCATTGGAA 3'	
IL-1 β Forward	5' GACAGAACAATAAGCCAACA 3'	Aires et al. [28]
IL-1 β Reverse	5' ACACAGGACAGGTATAGATT 3'	
GSK3- β Forward	5' TACCCATACGATGTTCCAGAT 3'	Jiang et al. [29]
GSK3- β Reverse	5' ACCCTGCCCAGGAGTTGCCAC 3'	
TNF- α Forward	5' TCAGCCGATTTGCCATTTTCAT 3'	Cai et al. [30]
TNF- α Reverse	5' ACACGCCAGTCGCTTCACAGA 3'	

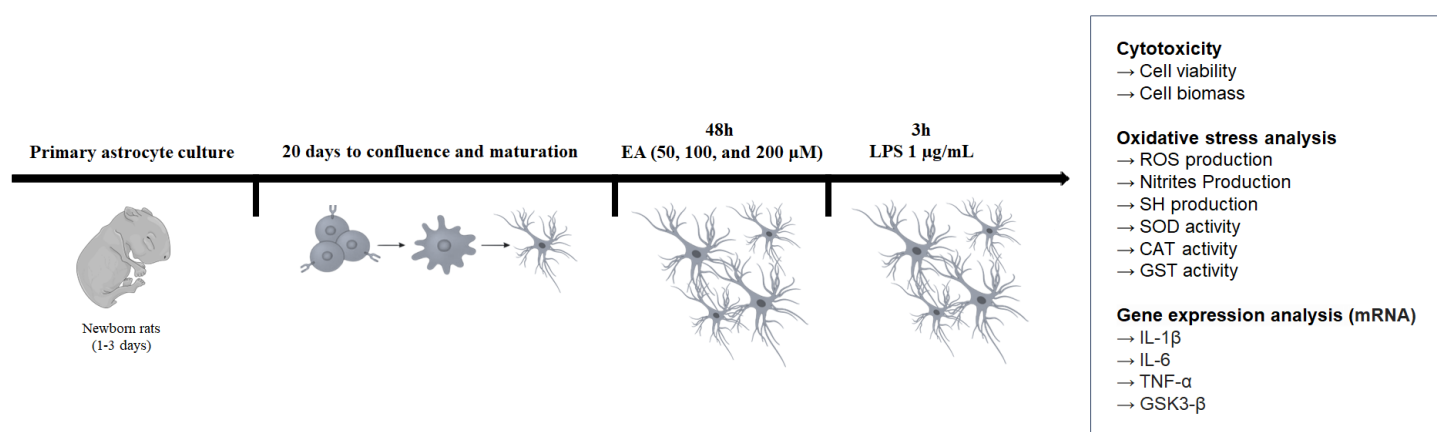


Figure 1 – Experimental scheme of ellagic acid (AE) treatment in primary astrocytes culture and exposure to lipopolysaccharide (LPS).

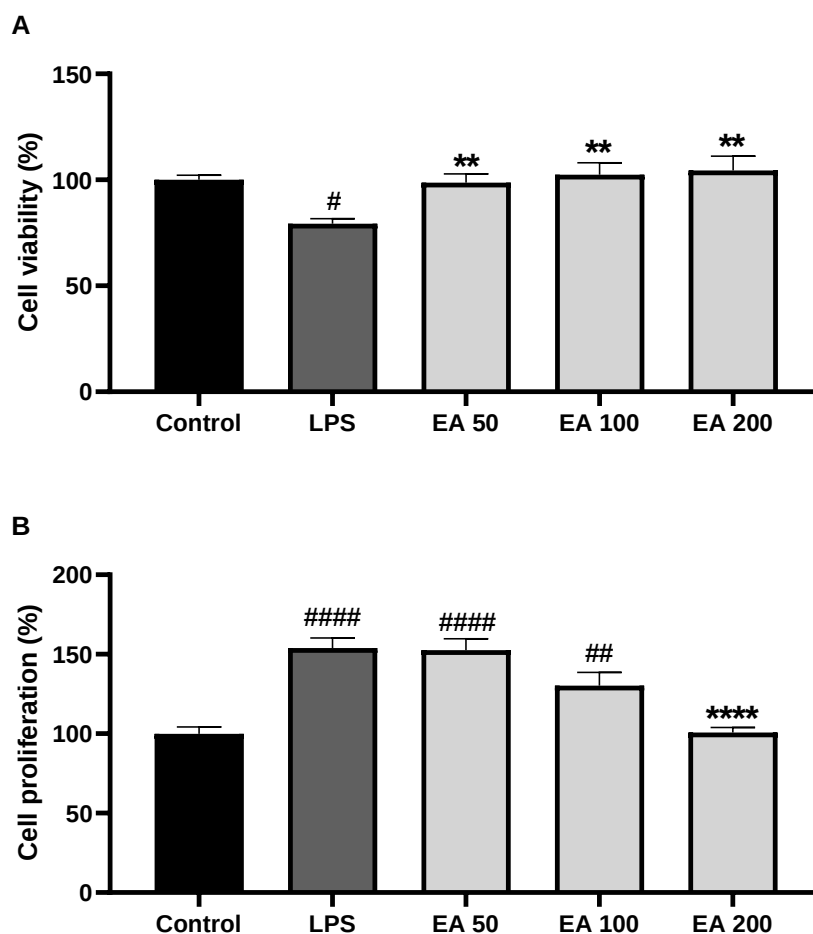


Figure 2 – Cellular viability and proliferation of astrocytes treated with ellagic acid (EA) and exposed to lipopolysaccharide (LPS). The values represent the mean $\pm$ standard error of the mean, with experiments conducted in triplicate. Data analysis was performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. ** $P \leq 0.01$ and **** $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from control cells; # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$, and #### $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from the LPS group.

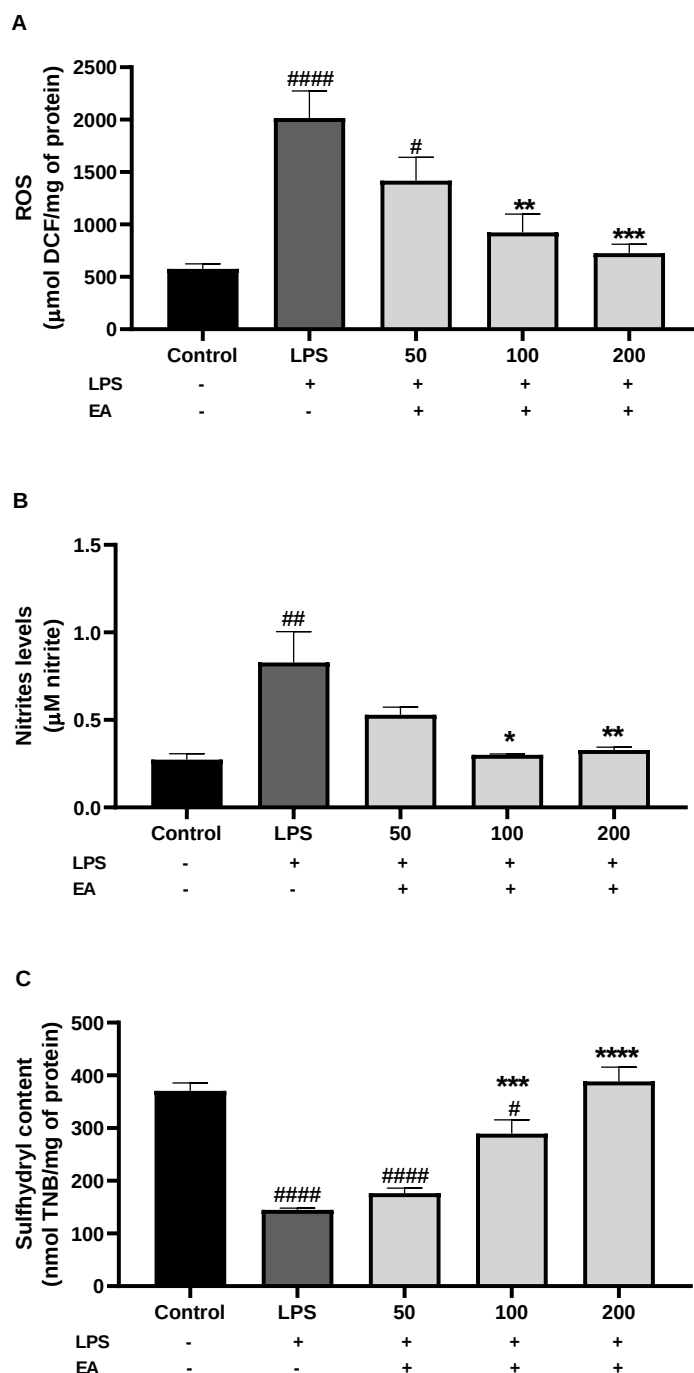


Figure 3 - Reactive oxygen species (ROS), nitrites, and total thiol content (SH) in astrocytes treated with ellagic acid (EA) and exposed to lipopolysaccharide (LPS). The values represent the mean $\pm$ standard error of the mean, with experiments conducted in triplicate. Data analysis was performed using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ and **** $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from control cells;

#P ≤ 0.05, ## P ≤ 0.01, and #### P ≤ 0.0001 indicate a significant difference from the LPS group.

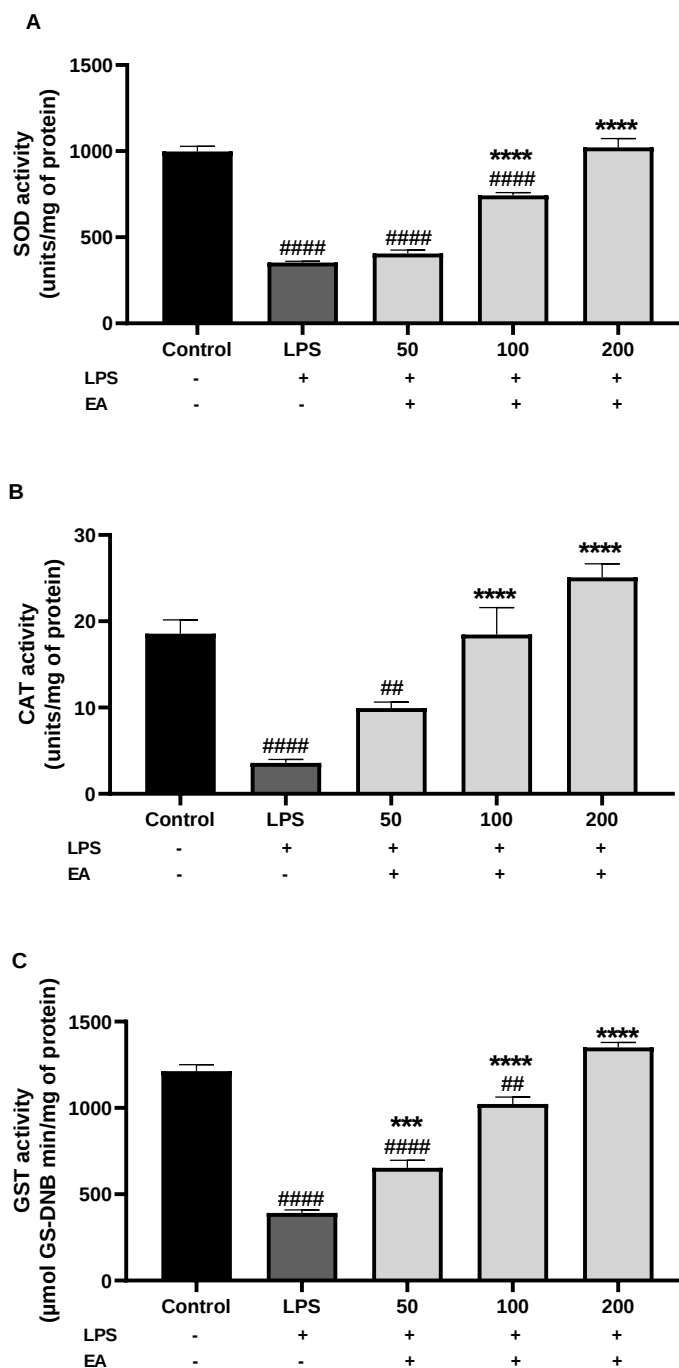


Figure 4 – Superoxide dismutase (A), Catalase (B) and Glutathione - S-Transferase (c) in astrocytes treated with ellagic acid (EA) and exposed to lipopolysaccharide (LPS). The values represent the mean ± standard error of the mean, with experiments conducted in triplicate. Data analysis was performed

using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. *** $P \leq 0.001$ and **** $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from control cells; ## $P \leq 0.01$ and ##### $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from the LPS group.

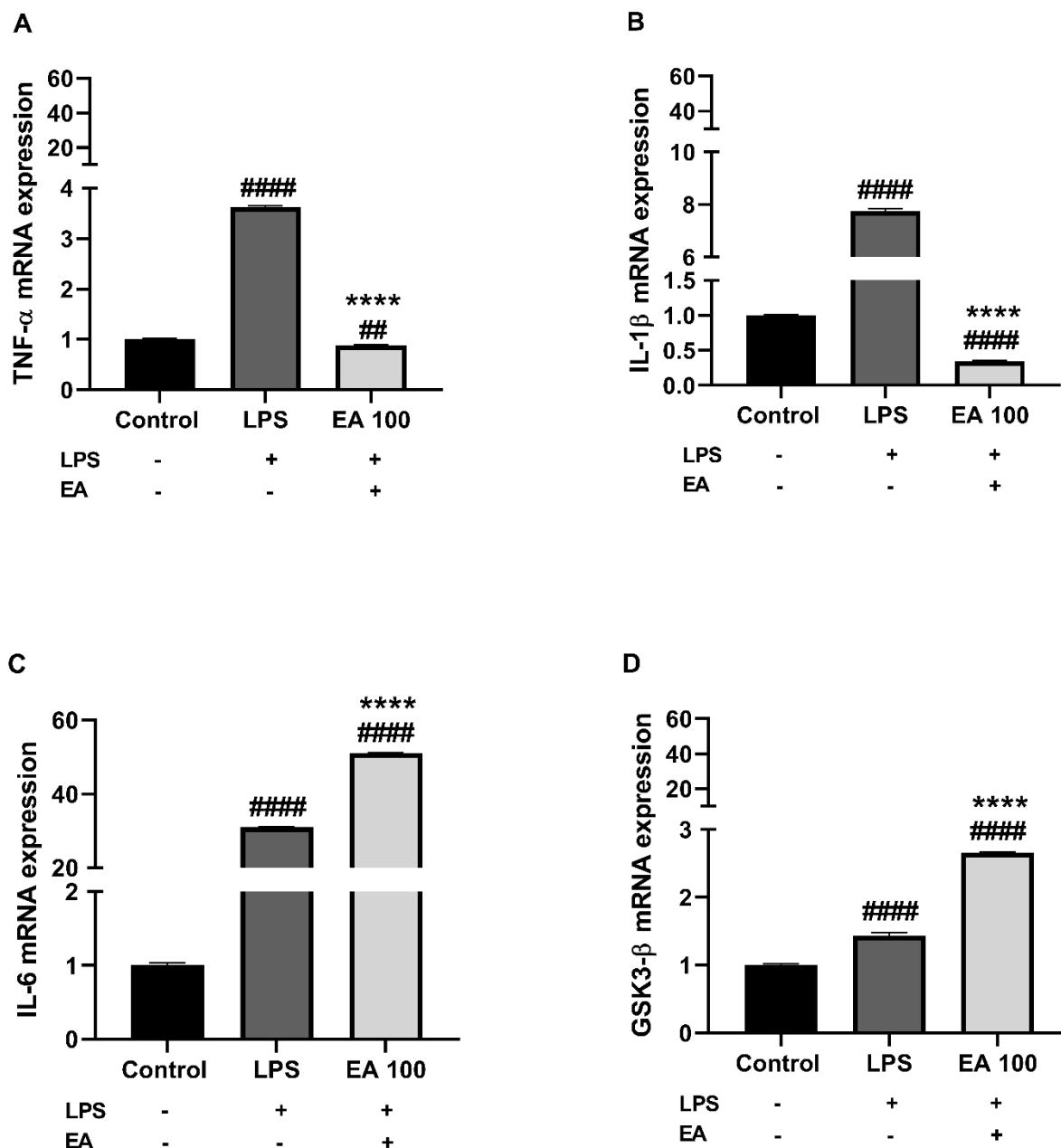


Figure 5 - Gene expression IL- β , TNF- α , IL-6 and GSK3 - β in astrocytes treated with ellagic acid (EA) and exposed to lipopolysaccharide (LPS). Values represent the mean $\pm$ standard error of three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by

Tukey's post hoc test. **** $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from control cells; ## $P \leq 0.01$ and ##### $P \leq 0.0001$ indicate a significant difference from the LPS group.

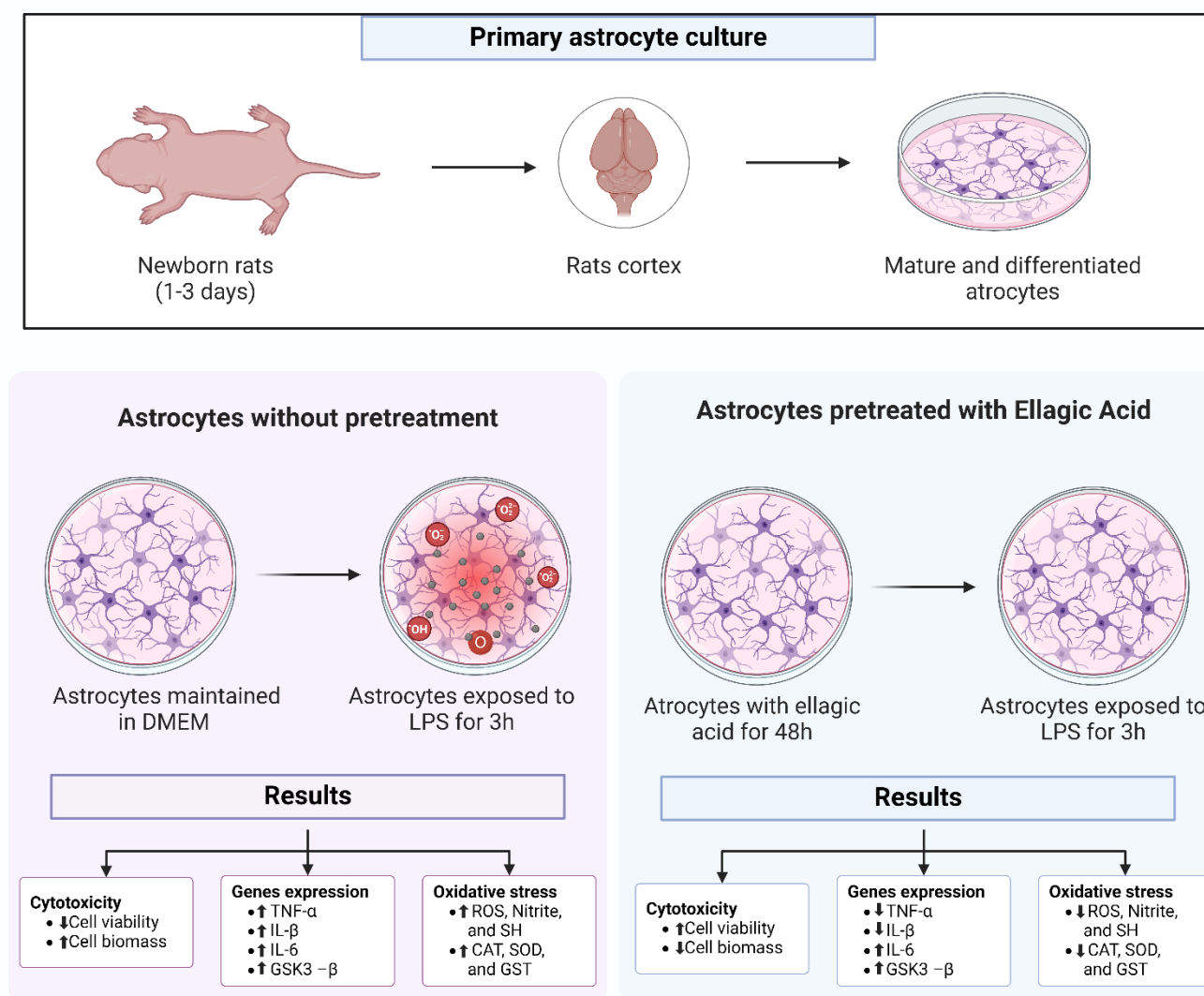
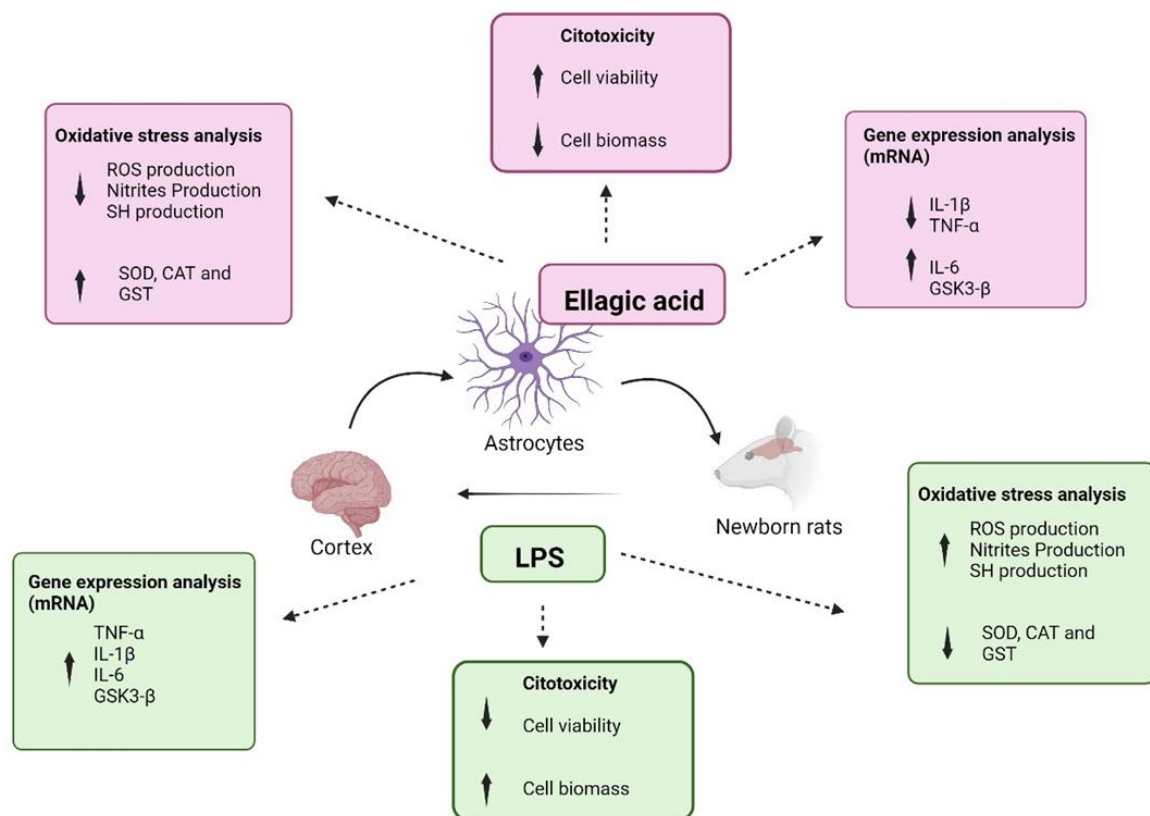


Figure 6 - Overview results. Ellagic acid (EA) prevents cytotoxicity, oxidative damage, and alterations in pro-inflammatory markers in astrocytes exposed to lipopolysaccharide (LPS), a potent pro-inflammatory agent known to induce inflammatory conditions. These findings highlights the therapeutic potential of EA as a modulator of astrocytic mechanisms implicated in neuroinflammation, providing new insights for the development of novel therapeutic approaches for neurological diseases.



Graphical abstract

5 DISCUSSÃO

O AE demonstra uma diversidade de propriedades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores (Zuccarl *et al.*, 2020; Evtyugin *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021). Entretanto, são escassas as evidências acerca dos impactos do AE nas respostas inflamatórias em astrócitos. No contexto relacionado as doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla, os astrócitos emergem como alvos terapêuticos importantes, uma vez que estão associados a neuroinflamação (Teleanu *et al.*, 2022). A ativação crônica ou exacerbada dos astrócitos induz à expressão e produção de mediadores inflamatórios, além do aumento nos níveis de espécies reativas (Vivancos *et al.*, 2015).

Os resultados deste estudo inicialmente evidenciaram que a exposição dos astrócitos ao LPS diminuiu a viabilidade e aumentou a biomassa celular, além de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o dano oxidativo em astrócitos. Esses dados sugerem que estes efeitos podem ter sido mediados pela ativação dos receptores TLR4 localizados na membrana celular dos astrócitos. Após a ativação, o TLR4 desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, resultando na expressão de diversos mediadores inflamatórios, fatores apoptóticos e componentes relacionados à autofagia (Ko *et al.*, 2015. Wiercioch *et al.*, 2022). Ademais, esse processo pode ser exacerbado pela excitotoxicidade induzida pelo glutamato e pela disfunção mitocondrial, resultando em aumento nos níveis de ERO e ERN, contribuindo, assim, para a amplificação da resposta inflamatória (Geyer *et al.*, 2019).

Os resultados deste estudo estão em concordância com outros achados da literatura que utilizam o LPS em cultivos primários de astrócitos. O LPS promoveu um aumento na biomassa celular e nos níveis de ERO e nitritos nesses cultivos. Além disso, foi observada uma redução na viabilidade celular, conteúdo total de sulfidrilas e na atividade da SOD (Fachel *et al.*, 2020; Pacheco *et al.*, 2018). Assim, esses resultados sugerem um impacto negativo do LPS nas funções celulares e antioxidantes dos astrócitos.

No entanto, neste estudo, o tratamento com AE (50, 100 e 200 μ M)

evidenciou um aumento significativo na viabilidade celular e uma diminuição da biomassa celular dos astrócitos. O estresse oxidativo induzido pelo LPS resultou em um acúmulo de ERO e ERN, promovendo a agregação de proteínas e danos ao DNA. Este mecanismo pode desencadear a autofagia nos astrócitos, um processo intracelular que degrada os lisossomos com os componentes citoplasmáticos das organelas citoplasmáticas (Sung *et al.*, 2020). No entanto, o potencial antioxidante do AE pode ter neutralizado as ERO e ERN, contribuindo para proteger os astrócitos dos danos oxidativos induzidos pelo LPS (Alfei *et al.*, 2020).

Os resultados desse trabalho estão em conformidade com estudos realizados em astrócitos, micróglias e cardiomiócitos expostos ao LPS, cádmio e clozapina, respectivamente (Ahangari *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2008). Esses estudos utilizaram concentrações de AE variando de 10 a 100 μ M, corroborando com os achados do presente trabalho. Os efeitos mencionados são atribuídos às potentes propriedades antioxidantes do AE, que atuam neutralizando os radicais livres responsáveis por danos celulares. Ao proteger as células do estresse oxidativo, o AE contribui para a preservação de sua estrutura e função, prevenindo danos celulares (García-Niño *et al.*, 2015). Assim, os resultados deste estudo sugerem que o AE pode proteger os astrócitos contra os danos causados pelo LPS através de mecanismos antioxidantes.

Corroborando com a hipótese anterior, os dados da presente pesquisa demonstraram que AE efetivamente inibiu ERO e nitritos induzido pela exposição do LPS em astrócitos. Nesse sentido, os grupos hidroxila do AE e os sistemas lactona apresentam ligações de hidrogênio e também podem agir como aceptadores de elétrons e doadores de hidrogênio. Essa estrutura química possibilita a eliminação direta de uma ampla variedade de ERO, como radicais peroxil, radicais hidroxila, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito. (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Além disso, o AE é considerado um agente protetor contra o estresse oxidativo devido à sua capacidade prevista de regeneração e à sua resistência à redução após o metabolismo, o que possibilita que este composto polifenólico ofereça proteção contínua mesmo em concentrações baixas (Ríos *et al.*, 2018). Dessa forma, o AE protege a integridade dos lipídios de membrana e do DNA e

morte celular, fornecendo citoproteção (Evtyugin *et al.*, 2020; Zeb, 2018).

Pesquisas anteriores também evidenciaram a capacidade do AE de reduzir os níveis de ERO em diferentes tipos celulares e condições de estresse oxidativo. Por exemplo, a concentração de 30 μM de AE demonstrou eficácia na redução dos níveis de ERO em astrócitos expostos ao cádmio (Yang *et al.*, 2008). Da mesma forma, concentrações de 10, 20 e 50 μM de AE, administradas por quatro horas, foram capazes de diminuir os níveis de ERO em cardiomiócitos expostos à clozapina (Ahangari *et al.*, 2022). Adicionalmente, Bensaad *et al.* (2017) mostraram que o tratamento com AE em concentrações de 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas preveniu a produção de nitrito em macrófagos expostos ao LPS. Essas descobertas têm implicações significativas para a potencial aplicação terapêutica do AE no tratamento de condições patológicas associadas ao estresse oxidativo.

O AE não apenas tem a capacidade de neutralizar agentes pró-oxidantes, mas também demonstra aumentar a expressão e atividade de enzimas antioxidantes. Este estudo identificou que o AE restaurou a atividade das enzimas SOD, CAT e GST em astrócitos expostos ao LPS. Pesquisas anteriores demonstraram que o AE ativa a via Nrf2, resultando na translocação do fator de transcrição Nrf2 para o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, o Nrf2 se liga aos elementos de resposta antioxidante no DNA, promovendo a transcrição de genes envolvidos na síntese de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GST, entre outras, que desempenham funções essenciais na defesa celular contra o estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2019).

Após a transcrição, as enzimas SOD e CAT desempenham um papel crucial na neutralização das ERO, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, enquanto a CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (He *et al.*, 2020; Ríos *et al.*, 2018). Por outro lado, a enzima GST, composta por um conjunto de isoenzimas, desempenha um papel na metabolização de substâncias xenobióticas, e alterações em sua atividade estão associadas a complicações em doenças inflamatórias. (**Figura 2**).

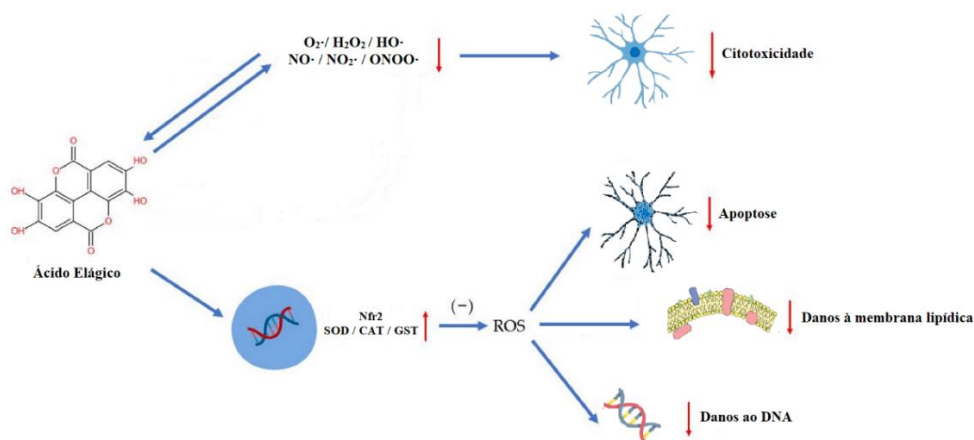


Figura 2: Mecanismo antioxidante do AE. Apatado (Zhu *et al.*, 2022)

Conforme demonstrado por Khan *et al.* (2022), houve um aumento significativo nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT em ratos submetidos a tratamento com AE na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias, em um modelo experimental de artrite nas articulações dos joelhos. Adicionalmente, Ardah *et al.* (2020) constataram, em um estudo sobre a doença de Parkinson em camundongos C57BL/6, que o tratamento com AE na concentração de 10 mg/kg durante sete dias resultou em uma diminuição nos níveis de GFAP e peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade das enzimas SOD e CAT. Em outro estudo realizado em rins de ratos Wistar Vijaya Padma *et al.* (2014) demonstraram que o AE na dose de 10 mg/kg resultou em um aumento significativo nas atividades das enzimas SOD, CAT e GST em comparação com os ratos tratados apenas com 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina, um dos poluentes ambientais mais tóxicos. Portanto, os estudos corroboram com os nossos achados ao demonstrar que o tratamento com o AE atuou como um potente antioxidante.

Existe uma estreita relação entre estresse oxidativo e inflamação (Teleanu *et al.*, 2022). Conforme mencionado anteriormente, o AE pode fornecer proteção contra o estresse oxidativo devido às suas próprias propriedades químicas, além de modular a expressão de enzimas envolvidas neste processo (Sharifi-Rad *et al.*, 2022). Embora essas propriedades antioxidantes possam ajudar a prevenir

a inflamação, foi demonstrado que o AE possui atividades anti-inflamatórias potentes tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Zeb, 2018). Neste estudo, o AE foi capaz de inibir a expressão de IL-1 β e TNF- α induzida pelo LPS em cultivo primário de astrócitos. O mecanismo exato pelo qual o AE causa uma diminuição na expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α ainda não foi totalmente elucidado e requer maiores investigações. No entanto, estudos anteriores relataram que o AE suprime a síntese dessas citocinas pela inibição da via do factor nuclear kappa B (NF- κ B), uma via de sinalização celular crucial na regulação da resposta inflamatória (Zhu *et al.*, 2022).

Quando o astrócito é exposto a estímulos como agentes patogênicos como o LPS, o NF- κ B é ativado e transloca-se para o núcleo da célula, onde induz a transcrição de genes relacionados à inflamação, resultando na produção de mediadores inflamatórios como citocinas, inflamatórias (Ren *et al.*, 2017). Nesse contexto, o AE é capaz de inibir a ativação do NF- κ B em várias etapas do processo inflamatório. Ele pode impedir a fosforilação e subsequente degradação do inibidor de κ B (I κ B), que normalmente mantém o NF- κ B inativo no citoplasma. Além disso, o AE interfere na translocação do NF- κ B para o núcleo e na sua ligação aos elementos promotores de genes pró-inflamatórios como , impedindo assim a transcrição desses genes e IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Aslan *et al.*, 2020, 2021). Esses achados destacam o potencial do AE como um agente anti-inflamatório eficaz, que pode desempenhar um papel importante na modulação da resposta inflamatória em condições patológicas associadas ao estresse oxidativo (**Figura 3**).

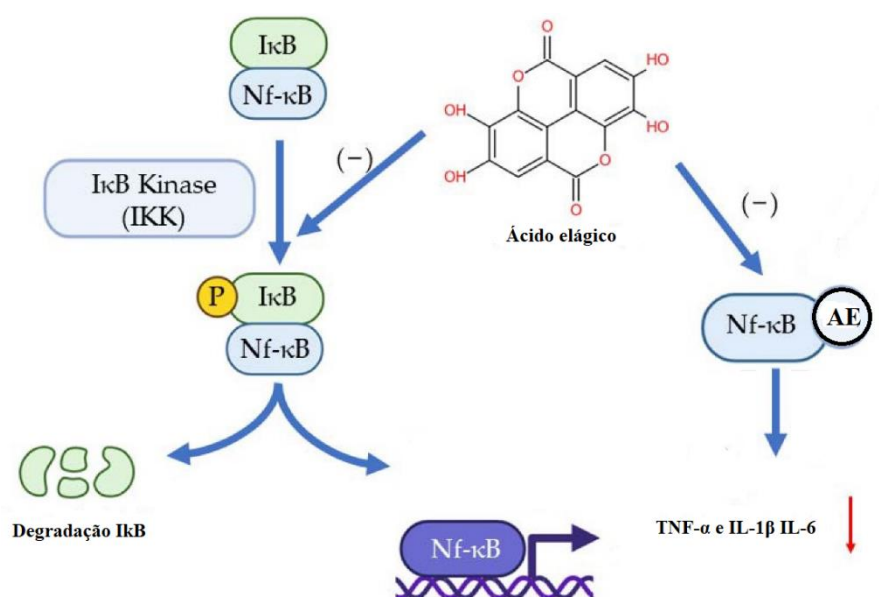


Figura 3: Mecanismo de anti-inflamatório do AE. Apatado (Zhu *et al.*, 2022)

Os resultados de vários estudos fornecem evidências promissoras sobre o potencial terapêutico do AE na modulação da resposta inflamatória em diferentes condições patológicas. He *et al.* (2020), demonstraram que o tratamento com AE inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1β, em células da microglia. Em outro estudo, Ardah *et al.* (2020) observaram que o tratamento com AE em camundongos com doença de Parkinson resultou na redução dos níveis de TNF-α, IL-1β e IL-6 na substância negra e estriado, indicando um potencial efeito anti-inflamatório. Além disso, Khan *et al.* (2022) relataram uma diminuição significativa nos níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 em ratos com artrite nos joelhos, após tratamento com AE.

Esses resultados sugerem que o AE possui propriedades anti-inflamatórias consistentes em diferentes modelos experimentais e condições patológicas, o que destaca seu potencial terapêutico como agente modulador da resposta inflamatória. Além disso, considerando que a neuroinflamação desempenha um papel crucial em várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, esses achados sugerem que o AE pode ser capaz de modular as respostas inflamatórias em astrócitos, células que desempenham um papel

importante na neuroinflamação (Kwon *et al.*, 2020). Portanto, o potencial do AE em modular as respostas astrócitárias pode representar uma via terapêutica promissora no tratamento de distúrbios neuroinflamatórios.

6 CONCLUSÃO

O LPS induziu dano oxidativo e inflamação em culturas primárias de astrócitos. O AE demonstrou eficácia em mitigar esses efeitos, que pode ser evidenciado pela redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitritos, bem como pelo aumento das atividades das enzimas antioxidantes, além da diminuição da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios.

Esses achados sugerem que o AE possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que podem modular mecanismos importantes em astrócitos, os quais estão associados a neuroinflamação. Ao atenuar o estresse e reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o AE pode desempenhar um papel importante na proteção dos astrócitos e na preservação da homeostase do SNC. Portanto, esses resultados destacam o potencial AE como um novo algo terapêutico para a mitigação dos mecanismos associados à neuroinflamação.

REFERÊNCIAS

AHANGARI, R. *et al.* Ellagic acid alleviates clozapine-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 1625–1633, 2022.

ALFEI, S.; MARENGO, B.; ZUCCARI, G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins?. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1–34, 2020.

ALLEN, N. J.; LYONS, D. A. Glia as architects of central nervous system formation and function. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 362, n. 6411, p. 181–185, 2018.

ALMEIDA, A.; JIMENEZ-BLASCO, D.; BOLAÑOS, J. P. Cross-talk between energy and redox metabolism in astrocyte-neuron functional cooperation. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 17, 2023.

ANDERSEN, J. V. *et al.* Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 196, 2021.

ARDAH, M. T. *et al.* Ellagic Acid Prevents Dopamine Neuron Degeneration from Oxidative Stress and Neuroinflammation in MPTP Model of Parkinson's Disease. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–17, 2020.

ASLAN, A. *et al.* The impact of ellagic acid on some apoptotic gene expressions: a new perspective for the regulation of pancreatic Nrf-2/NF-κB and Akt/VEGF signaling in CCl₄-induced pancreas damage in rats. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 145–152, 2021.

ASLAN, A. *et al.* The preventive effect of ellagic acid on brain damage in rats via regulating of Nrf-2, NF-κB and apoptotic pathway. **Journal of food biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 6, 2020.

BATISTA, C. R. A. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a

Bridge to Understand Neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 9, 2019.

BENSAAD, L. A. *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

BOONPRAMAN, N. *et al.* NOX4 as a critical effector mediating neuroinflammatory cytokines, myeloperoxidase and osteopontin, specifically in astrocytes in the hippocampus in Parkinson's disease. **Redox biology**, [s. l.], v. 62, 2023.

CALVO, B. *et al.* GSK3 β Inhibition by Phosphorylation at Ser389 Controls Neuroinflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 337, 2023.

CHEN, Y. *et al.* The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 53, n. 3, 2020.

DORNELLES, G. L. *et al.* Ellagic Acid Inhibits Neuroinflammation and Cognitive Impairment Induced by Lipopolysaccharides. **Neurochemical research**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 2456–2473, 2020.

EVTYUGIN, D. D.; MAGINA, S.; EVTUGUIN, D. V. Recent Advances in the Production and Applications of Ellagic Acid and Its Derivatives. A Review. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 12, 2020.

FACHEL, F. N. S. *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**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 123–139, 2020.

FANG, J.; SHENG, R.; QIN, Z. H. NADPH Oxidases in the Central Nervous System: Regional and Cellular Localization and the Possible Link to Brain Diseases. **Antioxidants & redox signaling**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 951–973, 2021.

GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological research**, [s. l.], v. 97, p. 84–103, 2015.

GEYER, S.; JACOBS, M.; HSU, N. J. Immunity Against Bacterial Infection of the Central Nervous System: An Astrocyte Perspective. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, 2019.

GIANFERRARA, T. *et al.* Glycogen Synthase Kinase 3 β Involvement in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 27, p. 4631–4697, 2022.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 805, 2020.

GUILLAMÓN-VIVANCOS, T.; GÓMEZ-PINEDO, U.; MATÍAS-GUIU, J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. **Neurologia (Barcelona, Spain)**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 119–129, 2015.

GUPTA, A. *et al.* Neuroprotective Potential of Ellagic Acid: A Critical Review. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1211, 2021.

HE, X. M. *et al.* Ellagic Acid Protects Dopamine Neurons via Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation in Microglia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2020, 2020.

KHAN, M. A. *et al.* Ellagic acid protects type II collagen induced arthritis in rat via diminution of IKB phosphorylation and suppression IKB-NF-kB complex activation: in vivo and in silico study. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1729–1743, 2022.

KO, H. M. *et al.* The Role of TLR4 and Fyn Interaction on Lipopolysaccharide-Stimulated PAI-1 Expression in Astrocytes. **Molecular neurobiology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 8–25, 2015.

KWON, H. S.; KOH, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders:

the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2020.

LAI, S. *et al.* New insights into the role of GSK-3 β in the brain: from neurodegenerative disease to tumorigenesis. **PeerJ**, [s. l.], v. 11, 2023.

LAWRENCE, J. M. *et al.* Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. **Acta neuropathologica communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023.

LEE, H. G.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 339, 2022.

LI, D. *et al.* Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. **Glia**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 878–897, 2020.

LI, X. *et al.* Reactive Astrogliosis: Implications in Spinal Cord Injury Progression and Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2020, 2020.

LIU, R. *et al.* NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2022.

NORTLEY, R.; ATTWELL, D. Control of brain energy supply by astrocytes. **Current opinion in neurobiology**, [s. l.], v. 47, p. 80–85, 2017.

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**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1107–1121, 2018.

PARK, M. W. *et al.* NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation via the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer's diseases. **Redox Biology**, [s. l.], v. 41, p. 101947, 2021.

PATANI, R.; HARDINGHAM, G. E.; LIDDELOW, S. A. Functional roles of reactive

astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 395–409, 2023.

RATHINAM, V. A. K.; ZHAO, Y.; SHAO, F. Innate immunity to intracellular LPS. **Nature immunology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 527, 2019.

REN, X. *et al.* Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 27, n. 13, p. 989, 2017.

RÍOS, J. L. *et al.* A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta Medica**, [s. l.], v. 84, n. 15, p. 1068–1093, 2018.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 360, n. 1, p. 201–205, 2017.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2022, 2022.

SINGH, S. *et al.* Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 395, n. 3, p. 285–294, 2022.

SKRZYPCZAK-WIERCIOCH, A.; SAŁAT, K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 17, 2022.

SUNG, K.; JIMENEZ-SANCHEZ, M. Autophagy in Astrocytes and its Implications in Neurodegeneration. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 432, n. 8, p. 2605–2621, 2020.

SURE, V. N. *et al.* A novel high-throughput assay for respiration in isolated brain microvessels reveals impaired mitochondrial function in the aged mice. **GeroScience**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 365, 2018.

TELEANU, D. M. *et al.* An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2022.

VIJAYA PADMA, V.; KALAI SELVI, P.; SRAVANI, S. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 4223–4232, 2014.

WANG, G. Q. *et al.* Ellagic acid supports neuron by regulating astroglia Nrf2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 738–743, 2019.

YAMADA, H. *et al.* Structural Revisions in Natural Ellagitannins. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 8, 2018.

YANG, C. S. *et al.* Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 825–834, 2008.

ZEB, A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. **Molecular and Cellular Biochemistry** 2018 448:1, [s. l.], v. 448, n. 1, p. 27–41, 2018.

ZHOU, L. *et al.* Oxycodone suppresses the lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by downregulating nuclear factor- κ B in hippocampal astrocytes of Sprague-Dawley rats. **Neuroreport**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 99–108, 2020.

ZHOU, B.; ZUO, Y. X.; JIANG, R. T. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 665, 2019.

ZHU, H. *et al.* Ellagic Acid and Its Anti-Aging Effects on Central Nervous System. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 23, n. 18, 2022.

ZUCCARI, G. *et al.* Formulation Strategies to Improve Oral Bioavailability of Ellagic Acid. **Applied Sciences** 2020, Vol. 10, Page 3353, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 3353, 2020.

ANEXO



PARECER Nº
PROCESSO Nº

152/2022/CEUA/REITORIA
23110.027159/2022-43

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Potencial terapêutico do ácido elágico em cultura de astrócitos expostas ao lipopolissacarídeo: estudos bioquímicos e moleculares”**, registrada com o nº **23110.027159/2022-43**, sob a responsabilidade de **Roselia Maria Spanevello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em reunião de 23/09/2022.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início = 23/09/2022 Término = 15/09/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	18
Idade	1-3 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPeI

Código para cadastro nº **CEUA 027159/2022-43**

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 28/09/2022, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1880029** e o código CRC **945C31AE**.

Referência: Processo nº 23110.027159/2022-43

SEI nº 1880029