

O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AÇAÍ APRESENTA EFEITO ANTI-NEUROINFLAMATÓRIO VIA MODULAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3

1

Tuyla Fontana², Francine Carla Cadoná³, Diulie Valente de Souza⁴, Michele Rorato Sagrillo⁵, Ana Cristina Andreazza⁶, Alencar Kolinski Machado⁷

¹ Projeto de Iniciação Científica da Universidade Franciscana

² Acadêmica do curso de Biomedicina - Laboratório de Genética e Cultura Celular, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasi Tuyla_fontana@hotmail.com

³ Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil. Fran.cine.bio@hotmail.com ³Coautor.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil. diully_desouza@hotmail.com

⁵ Laboratório de Genética e Cultura Celular, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil. sagrillorm18@gmail.com

⁶ Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Universidade de Toronto, Toronto, ON, Canadá. Ana.andreazza@utoronto.ca

⁷ Orientador do curso de Biomedicina - Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil. alencarkolinski@gmail.com

RESUMO

Doenças neuropsiquiátricas apresentam fisiopatologia complexa. Contudo, sabe-se que indivíduos com transtorno bipolar (TB), por exemplo, apresentam disfunção mitocondrial no complexo I. A partir disso, a busca por novos métodos terapêuticos vem aumentando em relação ao uso de produtos naturais, com isso vem sendo estudado o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) que possui propriedade anti-inflamatória. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anti-neuroinflamatório do açaí através da modulação do inflamassoma NLRP3. Foi então produzido e caracterizado o extrato de açaí. Micróglias foram cultivadas e ativadas com lipopolissacarídeo (LPS) e nigericina. Em seguida, estas células foram tratadas com o extrato. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato de açaí possui significativo efeito anti-neuroinflamatório e este potencial se dá através da modulação da expressão proteica do inflamassoma NLRP3. Sendo assim, conclui-se que o açaí é um produto natural com capacidade de modular a inflamação neural, podendo ser um forte candidato ao desenvolvimento farmacológico.

Palavras-chave: Doenças neuropsiquiátricas; Disfunção mitocondrial; *Euterpe oleracea* Mart.; Inflamassoma NLRP3

1. INTRODUÇÃO

As doenças neuropsiquiátricas se caracterizam como uma importante problemática de saúde pública mundial e apresentam uma fisiopatologia complexa. Há estudos que tentam compreender essas doenças. Andreazza e colaboradores (2010) descreveram que indivíduos com transtorno bipolar (TB), por exemplo, apresentam disfunção mitocondrial no complexo I. Essas doenças também estão vinculadas com a ativação inflamatória crônica e há relatos de que existe uma ligação com o metabolismo oxidativo de forma que o aumento dos níveis de espécie reativas de oxigênio (EROS) atua como agente indutor inflamatório estéril via ativação do inflamassoma NLRP3 (KIM et al., 2016). O inflamassoma NLRP3 é um complexo proteico com ASC e pró-caspase-1 que quando é ativado é capaz de liberar a caspase-1 ativa, seguida pelas interleucinas IL-1 β e IL-18, que induzem a ativação da cascata pró-inflamatória.

A partir disso, a busca por alternativas anti-inflamatórias baseadas em produtos naturais tem sido de interesse. Podemos exemplificar o estudo descrito por Machado e colaboradores (2019) sobre o açaí, que é cientificamente conhecido como *Euterpe oleracea* Mart, o qual apresentou potencial anti-inflamatório.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e caracterização do extrato hidroalcólico de açaí

Foram obtidos frutos de açaí frescos a partir de uma região de colheita da floresta tropical amazônica, os frutos foram transportados até o Laboratório de Cultura Celular da Universidade Franciscana sob refrigeração para que não houvesse perda das características funcionais do fruto. Chegando ao laboratório, os frutos foram completamente macerados para a remoção das sementes e logo após dispostos em frascos âmbar na concentração de 300 mg/mL utilizando como solvente o etanol 70%. Foram 21 dias totais de extração, sendo em seguida rotaevaporado e liofilizado para obtenção do produto em pó, então o extrato em pó foi conduzido para caracterização, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo injetado no aparelho o extrato diluído na concentração de 10 mg/mL no aparelho SIL-20^A Shimadzu *Auto Sampler*, sendo a coluna de separação Phenomenex C₁₈. Os padrões utilizados foram: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, epicatequina, orientina, cianeto-3-O-glicosídeo, luteolina e apigenina. Logo, a matriz química do extrato foi determinada através da comparação com os picos de leitura de tais padrões

2.2 Cultivo celular e tratamento

Primeiramente foram obtidas células da linhagem celular micróglia EOC 13 (BV-2) através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Universidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e

cultivadas em condições ideais de cultivo celular. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich – R8758, São Paulo, SP, Brasil) contendo 10 mM de HEPES (Ludwig - 0220402, Porto Alegre, RS, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, F2442, São Paulo, SP, Brasil) e suplementado com 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (100U/mL e 100mg/mL, respectivamente) (Gibco Thermo Fisher, 15140122, São Paulo, SP, Brasil) e 1% de antifúngico anfotericina B (Gibco Thermo Fisher, 15290018, São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas em incubadora de CO₂, com saturação de 5% de CO₂ e 37°C até a obtenção do número de células ideais para a realização de todos os tratamentos e ensaios experimentais.

Em relação ao tratamento foi realizada uma curva de concentração-efeito do extrato de açaí nas concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 100; 500; 1000 µg/mL durante 24h, 48h e 72h, onde a concentração que demonstrou melhor eficácia (resultou em viabilidade celular aproximada ao controle negativo) foi a de 0,1 µg/mL, sendo assim a escolhida para os demais testes.

2.2.1 Exposição aos agentes estressores

Para induzir a inflamação por meio de indutores inflamatórios DAMP's, as células BV-2 foram expostas ao LPS na concentração de 0,1 µg/mL e a nigericina na concentração 1µM, a fim de imitar os sinais de ativação de NLRP3, respectivamente. As células foram expostas ao LPS como indução do NLRP3-priming por 72 h. Após o tratamento inicial com LPS, as células foram tratadas com nigericina por 24 horas, para ativar a montagem do NLRP3. Uma curva de concentração-resposta foi realizada com o extrato hidroalcoólico de açaí liofilizado para determinar a concentração mais eficaz para reduzir a ativação inflamatória.

2.3 Determinação da viabilidade celular

Após os respectivos tratamentos e períodos de incubação, as células BV-2 foram submetidas a avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico no uso de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) conforme Kang e colaboradores (2010). O MTT é um reagente de coloração amarela que é capaz de penetrar o meio intracelular. Em células viáveis, este reagente é metabolizado a partir de enzimas intracelulares, formando cristais de formazan de coloração púrpura. Através da adição de dimetilsulfóxido (DMSO), estes cristais são solubilizados e externalizados ao meio extracelular. Desse modo, pode-se aferir a absorbância através de leitura espectrofotométrica em 570 nm. Logo, quanto maior a leitura obtida, maior a viabilidade celular.

2.4 Avaliação indireta da produção de óxido nítrico

As células foram avaliadas quanto a produção de óxido nítrico, depois do tempo de incubação

necessário, através de um ensaio colorimétrico de quantificação indireta de tal molécula gasosa. Este ensaio foi realizado baseando-se na metodologia descrita por Choi e colaboradores (2012), utilizando o reagente de *Greiss*. Este ensaio permite a medição de metabólitos de NO, nitrato e nitrito. Após a realização do ensaio e incubação de 15 minutos, a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm através de um leitor de placas.

2.5 Mensuração da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os níveis totais de EROs foram determinados utilizando o ensaio da 2'7 diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich-D6883; St. Louis, MO, EUA), como descrito por Costa e colaboradores (2012). Este reagente é um composto não fluorescente que é desacetilado pelas enzimas esterase mitocondriais em diclorodihidrofluoresceína (DCFH) que reage com as moléculas EROs e se torna diclorofluoresceína (DCF), um composto fluorescente. Logo, quanto maior a intensidade da fluorescência emitida, maior é a taxa total de EROs produzida. Logo, a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 525 nm utilizando o aparelho leitor de placas SpetraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

2.6 Mensuração da interleucina-1 β , da caspase-1 e do inflamassoma NLRP3

Foram mensuradas nas células BV-2 após os devidos tratamentos com a concentração mais efetiva do extrato hidroalcoólico de açaí e sua associação com o LPS e nigericina, as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β), bem como a expressão proteica do inflamassoma NLRP3 através de ensaio imunoenzimático (ELISA) através do *kit* comercial *QuantiKine Cytokines Immunoassay*® (R&D Systems – D2050; Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante.

2.7 Análise estatística.

Os dados obtidos foram tabelados em planilha do sistema Microsoft Excel, versão 2010, sendo os valores transformados para média \pm desvio padrão, então foram transformados em porcentagem em relação ao controle negativo e a análise estatística foi desenvolvida através de teste de variância de uma via, seguido de *post hoc* de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 5.0 (*GraphPad Prism software*, 2015; San Diego, CA, EUA). Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente foi produzido o açaí em pó e através da caracterização do extrato, foi detectada a presença de 10 moléculas bioativas compondo a matriz química, sendo as majoritárias, a orientina, a luteolina e o ácido *p*-cumárico (figura 1).

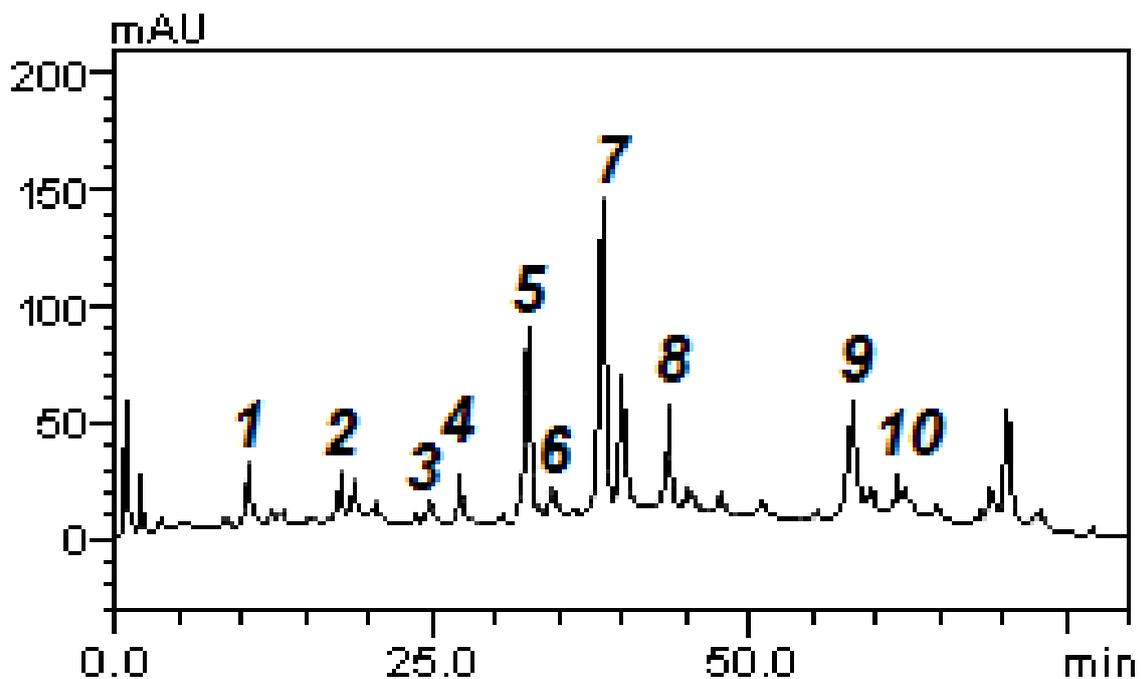
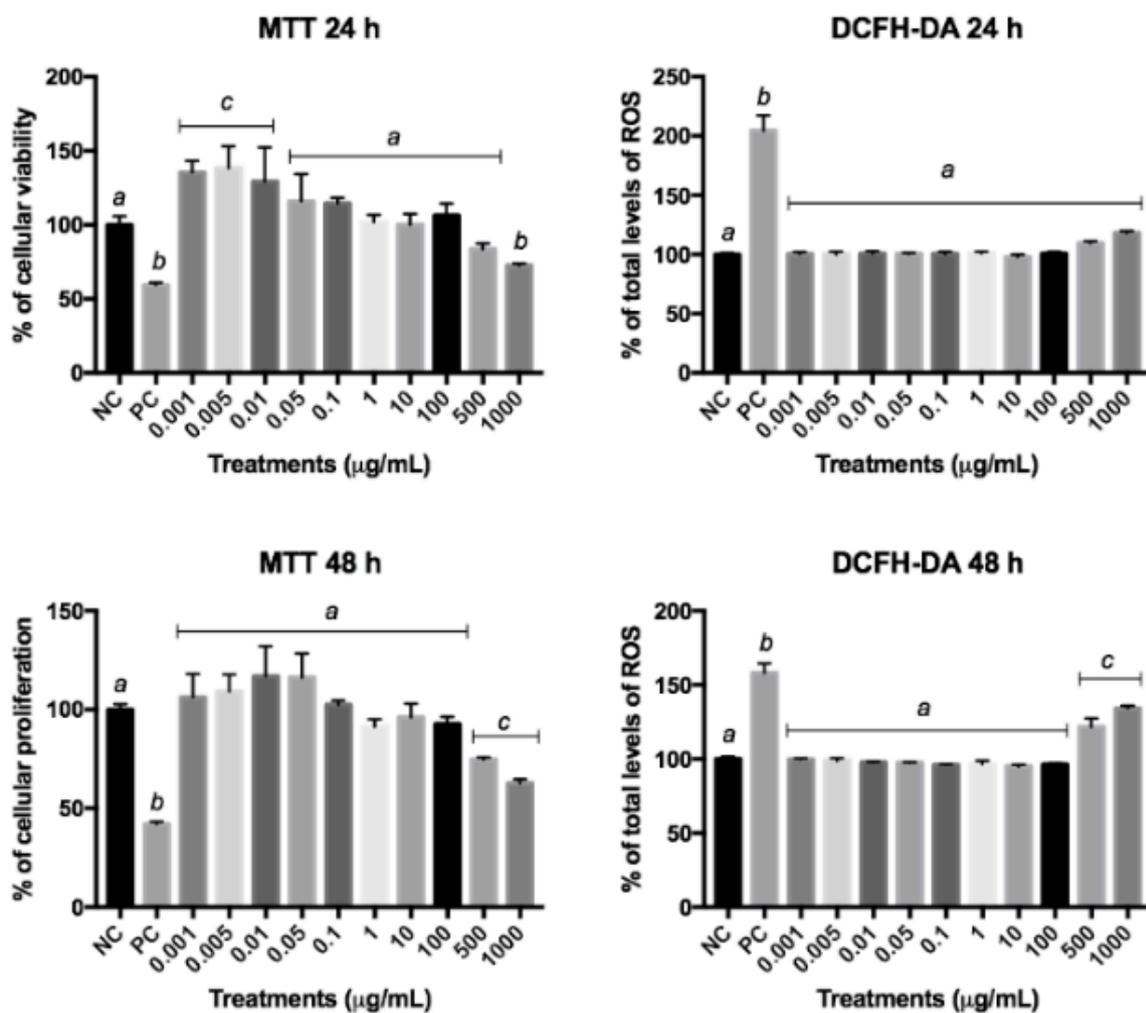


Figura 1: Caracterização do extrato de açai via análise cromatográfica. Cada pico representa uma molécula bioativa avaliada, sendo : 1. ácido gálico 2. Catequina 3. ácido clorogênico 4. ácido cafeico 5. ácido *p*-cumárico 6. epicatequina 7. Orientina 8. cianeto-3-0-glicosídeo 9. Luteolina 10. apigenina.

Sabe-se que a orientina é um flavonoide encontrado em plantas que possui expressivas atividades biológicas, dentre as quais pode-se destacar o efeito antioxidante (XIAO et al., 2018), antitumoral (KIM et al., 2018) e até mesmo anti-inflamatório (KU et al., 2014). A luteolina é conhecida cientificamente por seus efeitos antioxidante (SEELINGER et al., 2008), anti-diabético (SALIB et al., 2013), anti-inflamatório e neuroprotetor (NABAVI et al., 2015). Adicionalmente, o ácido *p*-cumárico é um potente antioxidante (MATHEW et al., 2015) e que pode atuar como cardioprotetor (KHEIRY et al., 2020).

Micróglia tratadas apenas com a curva concentração-efeito de extrato de açai (figura 2) apresentaram aumento na viabilidade celular em concentrações baixas (0,001-0,01 µg/mL) quando comparado ao controle negativo. Já a concentração de 1000 µg/mL foi capaz de reduzir a viabilidade celular. Após 48h de exposição ao extrato as células mantiveram a proliferação celular para a maioria das concentrações testadas a níveis semelhantes ao controle negativo. Já após 72h de tratamento, micróglia expostas a 0,001 e 0,005 µg/mL de extrato apresentaram aumento da

proliferação celular, enquanto que as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de induzir redução da proliferação celular. Contudo, a maioria das concentrações testadas, independente do tempo de exposição, mantiveram os níveis de produção de EROs. Tais resultados corroboram com os achados descritos por Machado e colaboradores (2016), onde neurônios-like foram expostos ao extrato de açaí nestas mesmas concentrações



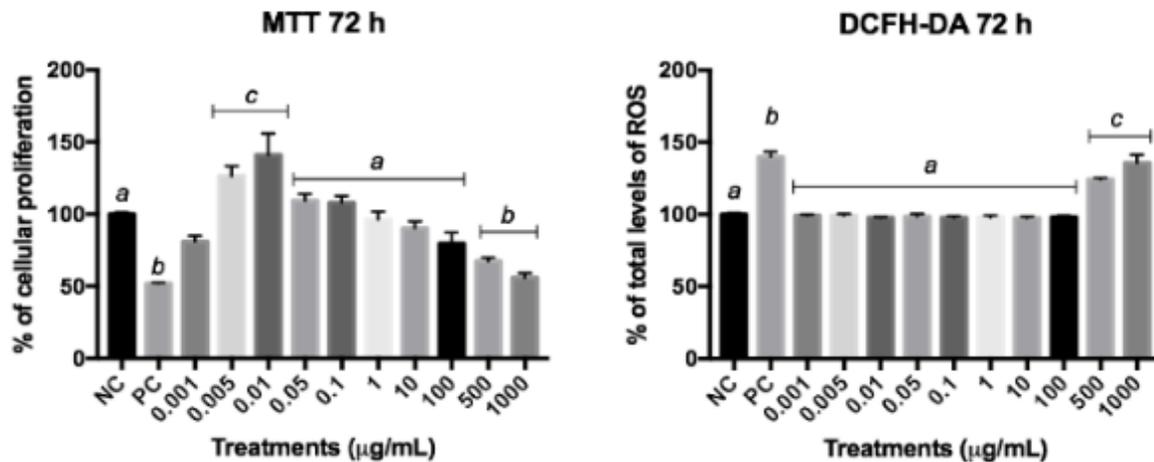


Figura 2: Micróglia expostas a uma curva concentração-efeito de extrato de açai. A) análise da viabilidade celular via ensaio MTT de células tratadas durante 24h; B) Avaliação da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas durante 24h; C) análise da proliferação celular via ensaio MTT de células expostas durante 48h; D) Avaliação da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas durante 48h; E) análise da viabilidade celular via ensaio MTT de células tratadas durante 72h; F) Avaliação da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas durante 72h. Foi conduzida análise estatísticas via ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos.

A melhor concentração foi de 1 mg/mL durante 72h de extrato de açai foi capaz de normalizar os índices de proliferação celular a níveis semelhantes ao controle negativo.

As células foram expostas ao lipossacarídeo (LPS) e a nigericina para induzir inflamação, após a indução da inflamação foram tratadas com extrato de açai por 24h, 48h e 72h. Para induzir a inflamação a concentração considerada eficaz de LPS foi de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 72h (figura 3). Já de nigericina foi a concentração de escolh foi 1 μM por 24h, a qual foi capaz de causar a ativação das micróglia (figura 4). Sabe-se que o LPS e a nigericina são excelentes moléculas capazes de ativar a resposta inflamatória em células de perfil imunológico (JANG et al., 2020).

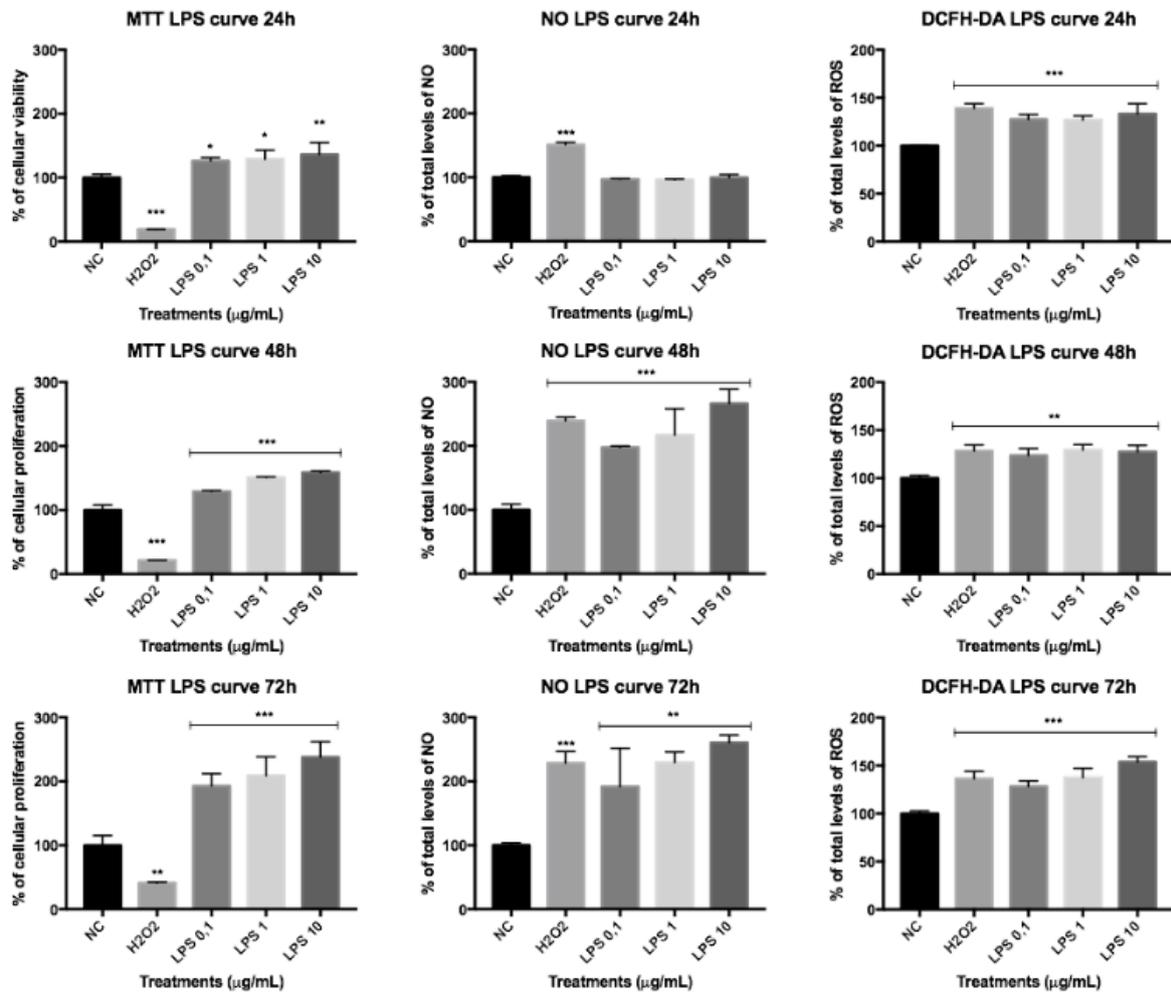


Figura 3: Micróglias expostas a diferentes concentrações de LPS. A) Análise da viabilidade celular de micróglias tratadas por 24h; B) Avaliação da produção de óxido nítrico em micróglias expostas por 24h; C) Medida da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 24h; D) Análise da proliferação celular de micróglias tratadas por 48h; E) Avaliação da produção de óxido nítrico em micróglias expostas por 48h; F) Análise da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 48h; G) Avaliação da proliferação celular de micróglias tratadas por 72h; H) Análise da produção de óxido nítrico em micróglias expostas por 72h; I) Avaliação da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 72h. Foi conduzida análise estatísticas via ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

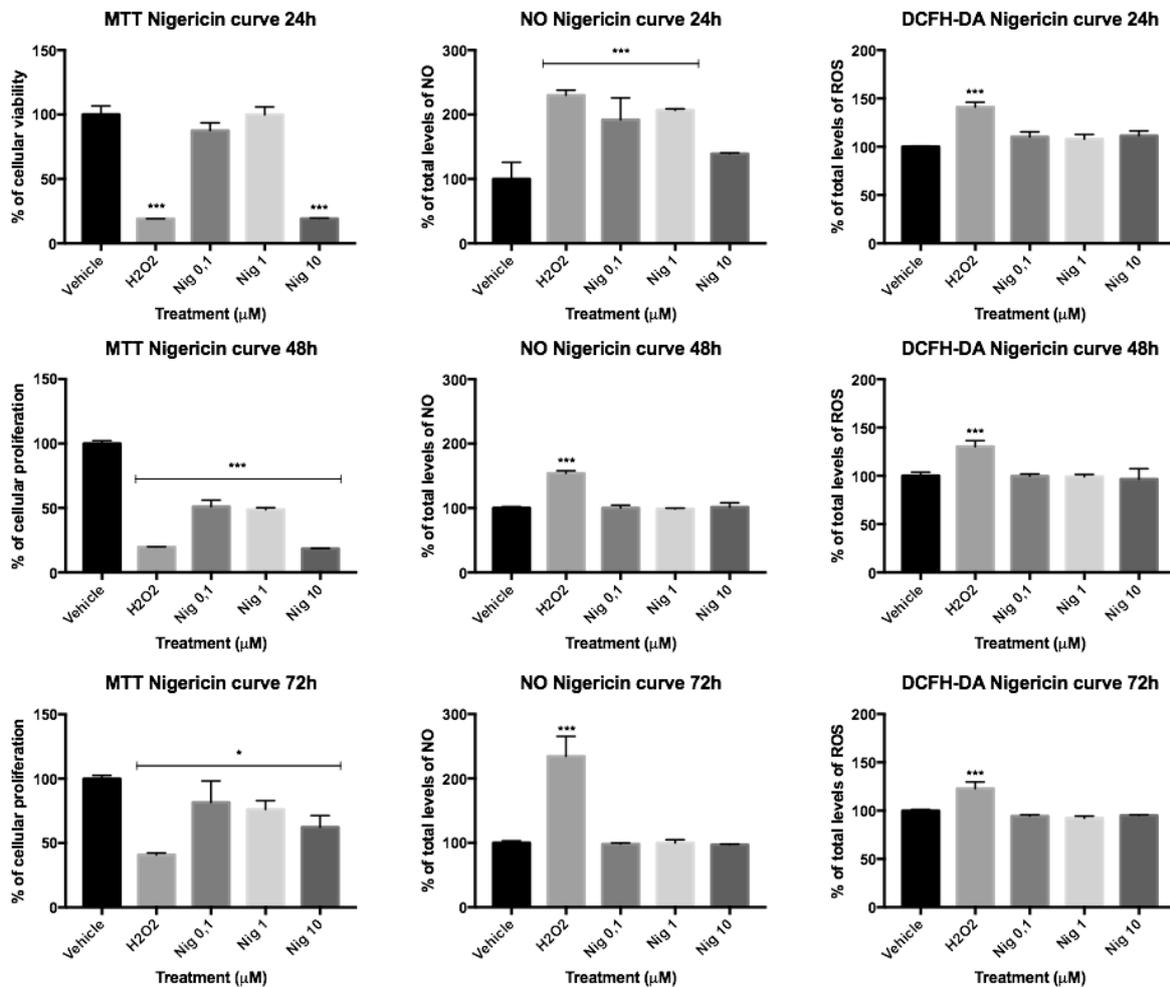


Figura 4: Exposição das micróglia a Nigericina A) Avaliação da viabilidade celular de micróglia tratadas por 24h; B) Análise da produção de óxido nítrico em micróglia expostas por 24h; C) Medida da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 24h; D) Avaliação da proliferação celular de micróglia tratadas por 48h; E) Análise da produção de óxido nítrico em micróglia expostas por 48h; F) Avaliação da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 48h; G) Análise da proliferação celular de micróglia tratadas por 72h; H) Avaliação da produção de óxido nítrico em micróglia expostas por 72h; I) Análise da taxa total de espécies reativas de oxigênio em células tratadas por 72h. Foi conduzida análise estatísticas via ANOVA de uma via, seguido de *post hoc* de Tukey. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Por fim, o extrato de açaí induziu redução dos parâmetros de estresse oxidativo e modulou positivamente a expressão proteica do inflamassoma NLRP3, da caspase-1 e da interleucina-1b, em micróglia ativadas pelo sinergismos LPS-nigericina. Tais resultados estão

condizentes com os dados publicados por Machado e colaboradores (2019), onde o extrato de açaí atuou como anti-inflamatório em macrófagos ativados com fitohemaglutinina, através da modulação do inflamassoma NLRP3 e das citocinas pró-inflamatórias.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, acredita-se que o extrato hidroalcoólico de açaí possui potente efeito anti-neuroinflamatório e pode ser uma excelente alternativa ao desenvolvimento de estudos de caráter farmacológico que visem produzir fármacos ou suplementos destinados a pacientes com problemáticas neuropsiquiátricas. Observou-se que o extrato de açaí hidroalcoólico liofilizado reduziu a transcrição de NLRP3 e pró-caspase-1, causando menos suprimentos necessários para a montagem do complexo proteico NLRP3 e atuou reduzindo o conjunto do inflamassoma NLRP3, diminuindo também a liberação ativada de caspase-1, potencialmente diminuindo a cascata de citocinas pró-inflamatórias.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) – Auxílio Recém Doutor (ARD)

5. REFERÊNCIAS

- ANDREAZZA, A. C.; SHAO, L.; WANG, J-F.; YOUNG, L. T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Archives of General Psychiatry**. v. 67, p. 360-368, 2010.
- CHOI, W. S.; SHIN, P. G.; LEE, J. H.; KIM, G. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**. v. 280, p. 164–170, 2012.
- COSTA, F.; DORNELLES, E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; ALGARVE, T. D.; DE SOUZA FILHO, O. C.; SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F.; DA CRUZ, I. B. M. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive Biomedicine**. v. 24, p. 474-481, 2012.
- JANG, J. H.; LEE, S. H.; JUNG, K.; YOO, H.; PARK, G. Inhibitory Effects of Myricetin on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Brain Sciences* v.10, 2020.

- KANG, K. S.; WANG, P.; YAMABE, N.; FUKUI, M.; JAY, T.; ZHU, B. T. Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells *In Vitro* and *In Vivo* via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. **PlosOne**. v. 5, 2017.
- [KHEIRY, M.](#); [DIANAT, M.](#); [BADAVI, M.](#); [MARD, S. A.](#); [BAYATI, V.](#) Does p-coumaric acid improve cardiac injury following LPS-induced lung inflammation through miRNA-146a activity?. [Avicenna Journal Phytomedicine](#). v. 10, p. 50-57, 2020.
- KIM, S. J.; PHAM, T. H.; BAK, Y.; RYU, H. W.; OH, S. R.; YOON, D. Y. Orientin inhibits invasion by suppressing MMP-9 and IL-8 expression via the PKCalpha/ERK/AP-1/STAT3-mediated signaling pathways in TPA-treated MCF-7 breast cancer cells. *Phytomedicine*. v. 50, p. 35–42, 2018.
- KIM, H. K.; CHEN, W.; ANDREAZZA, A. C. The Potential Role Of The NLRP3 Inflammasome As A Link Between Mitochondrial Complex I Dysfunction And Inflammation In Bipolar Disorder. **Neural Plasticity**. V. 2015, p. 1-10, 2015.
- KU, S. K.; KWAK, S.; BAE, J. S. Orientin inhibits high glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation*. v. 37, p. 2164–2173, 2014.
- MACHADO, A. K.; ANDREAZZA, A. C.; da SILVA, T. M.; BOLIGON, A. A.; do NASCIMENTO, V.; SCOLA, G.; DUONG, A.; CADONÁ, F. C.; RIBEIRO, E. E.; da CRUZ, I. B. M. Neurportective effects of açai (Euterpe oleracea Mart.) against rotenone in vitro exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V. 2016, p. 1-14, 2016.
- MACHADO, A. K.; CADONÁ, F. C.; ASSMANN, C.E.;ANDREAZZA, A. C. MEDEIROS, M. M.; BRANCO C.A.; ZHOU X.; SOUZA. D.V.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B. M. N AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) POSSUI POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO POR MEIO DA MODULAÇÃO DO INFLAMASSOMA NLRP3. **JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS**. V. 56, P. 364-371, 2019.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; ZAKARIA, Z. A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions, *Journal of Food Science and Technology*. v. 52, p. 5790–5798, 2015.
- NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; GORTZI, O.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; DAGLIA, M.; SKALICKA-WOŃNIAK, K.; NABAVI, S. M. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*. v. 119, p. 1-11, 2015.
- SEELINGER, G.; MERFORT, I.; AND SCHEMPP, C. M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Medica*. v. 74, p.1667-1677, 2008.

- SALIB, J. Y.; MICHAEL, H. N.; ESKANDE, E. F. Anti-diabetic properties of flavonoid compounds isolated from *Hyphaene thebaica* epicarp on alloxan induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*. v. 5, p. 22–9, 2013.

-XIAO, Q.; PIAO, R.; WANG, H.; LI, C.; SONG, L. Orientin-mediated Nrf2/ HO-1 signal alleviates H₂O₂-induced oxidative damage via induction of JNK and PI3K/AKT activation. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 118, p. 747–755, 2018.