

Artigo Original

Estresse Oxidativo em um Modelo *In Vitro* de Inflamação Aguda em Células Imunes PeriféricasOxidative Stress in an *In Vitro* Model of Acute Inflammation in Peripheral Immune Cells<http://dx.doi.org/10.18316/sdh.v11i3.10347>

Ana Lidia Toebe^{1#} ORCID 0000-0002-3857-1939, Suelen da Rocha Abdallah^{1#} ORCID 0000-0001-7899-3880, Kelly Rodrigues-Conrad² ORCID 0000-0002-8040-2805, Isadora Kottwitz da Silva¹ ORCID 0000-0001-5052-9875, Kendra Caroline Grams¹ ORCID 0000-0002-1676-5943, Viviane Cecília Kessler Nunes² ORCID 0000-0001-6797-0376, Josiane Woutheres Bortolotto² ORCID 0000-0003-0271-1685, Gabriela Bonfanti-Azzolin² ORCID 0000-0003-2602-6092, Mariana Migliorini Parisi^{2*} ORCID 0000-0002-2298-7809

RESUMO

Introdução: A inflamação é caracterizada como um conjunto de alterações bioquímicas e imunológicas. Evidências apontam a relação entre o estresse oxidativo e a inflamação. **Objetivo:** Estabelecer um modelo de inflamação aguda *in vitro* em células imunes periféricas pela exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), a fim de avaliar se o ambiente inflamatório gerado através de um produto bacteriano é capaz de, em curto período, modular positivamente a atividade da AChE e induzir alterações oxidativas. **Materiais e Métodos:** Estudo experimental *in vitro* onde células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de 9 indivíduos saudáveis foram expostas, *in vitro*, a 100 ng/mL de LPS por uma, três e seis horas. Nas PBMC, após a exposição ao LPS, foi avaliada a fosforilação de Fator Nuclear kappa B (NFkB), estresse oxidativo e atividade da acetilcolinesterase (AChE). **Resultados:** Foi constatado que a inflamação induzida por LPS aumentou a fosforilação da subunidade p65 de NFkB em uma hora e diminuiu os grupamentos tiólicos totais das PBMC em seis horas, sem alterar a peroxidação lipídica e a atividade da AChE. **Conclusão:** Nosso estudo sustenta a hipótese de que a inflamação, mesmo em curto período, causa um desequilíbrio redox em células imunes.

Palavras-chave: Inflamação; Lipopolissacarídeo; Estresse oxidativo; Acetilcolinesterase.

1 Grupo de Pesquisa em Atenção Integral à Saúde, Centro de Ciências da Saúde e Agrárias, Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde, Universidade de Cruz Alta, RS, Brasil.

#Contribuíram igualmente para o trabalho

*Autor correspondente: Centro de Ciências da Saúde e Agrárias, Universidade de Cruz Alta, Rodovia Municipal Jacob Della Mea, Km 5.6 – Parada Benito, CEP 98005-972, Fone (55) 3321-1596. E-mail: mariana_parsi@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is characterized as a set of biochemical and immunological changes. Evidence points to the relationship between oxidative stress and inflammation. **Objective:** To establish an *in vitro* model of acute inflammation in peripheral immune cells for exposure to lipopolysaccharide (LPS), in order to assess whether the inflammatory environment generated through a bacterial product is capable of, in a short period, positively modulating AChE activity and induce oxidative alterations. **Materials and Methods:** *In vitro* experimental study with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 9 healthy individuals exposed, *in vitro*, at 100 ng/mL of LPS per one, three and six hours. In PBMC, after exposure to LPS, it was assessed for nuclear factor Kappa B (NFkB) phosphorylation, oxidative stress and acetylcholinesterase (AChE) activity. **Results:** It was found that LPS-induced inflammation increased the phosphorylation of the p65 NFkB subunit within one hour and decreased the total thiol clusters of PBMC within six hours, without altering lipid peroxidation and AChE activity. **Conclusion:** Our study supports the hypothesis that inflammation, even in a short period, causes a redox imbalance in immune cells.

Keywords: Inflammation; Lipopolysaccharide; Oxidative stress; Acetylcholinesterase.

INTRODUÇÃO

A inflamação é caracterizada como um conjunto de alterações bioquímicas e imunológicas nos tecidos que inclui principalmente o recrutamento de leucócitos até o meio inflamado, o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e indução de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas¹. Esse processo é uma proteção fundamental do organismo, que tem por objetivo principal a ativação de células imunes e restauração da integridade e da função do tecido lesado. Entretanto, respostas inflamatórias mal reguladas podem afetar a homeostase celular e tecidual².

A inflamação é iniciada por uma vasta gama de moléculas imunogênicas. O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede celular externa de bactérias gram-negativas que atua como potente mediador pró-inflamatório, através da ligação a receptores próprios nas células imunes, como os receptores Toll-like receptor 4 (Toll-4 ou TLR-4). O TLR-4 reconhece o LPS através da via dependente do Fator Nuclear kappa B (NFkB), fator de transcrição que controla a produção de citocinas e desempenha um papel importante durante a inflamação. Neste contexto, a concentração aumentada de citocinas, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na inflamação mediada pela via NFkB pode modificar a expressão ou a atividade de diferentes marcadores nas células imunes³. Deste modo, modelos de inflamação *in vivo*^{4,5} e modelos *in vitro*^{6,7} induzidos por LPS são bem estabelecidos na literatura para o estudo de mecanismos inflamatórios.

As espécies reativas são geradas em condições fisiológicas e quando em excesso são prejudiciais ao organismo. O desequilíbrio entre a formação das espécies reativas e as defesas antioxidantes ocasionam o estresse oxidativo (EO), condição que, quando não solucionada pode causar danos aos lipídios, que por sua vez são responsáveis por manter a integridade das membranas celulares⁸. Além disso, o produto da peroxidação lipídica são os peróxidos lipídicos, que se degradam em compostos capazes de reticular DNA e proteínas. As defesas antioxidantes, por sua vez, são responsáveis por neutralizar os danos causados pelos radicais livres. Neste sentido, o sistema antioxidante pode ser classificado como enzimático, que incluiu enzimas como Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) e não-enzimático, que inclui moléculas produzidas endogenamente como a Glutathione Reduzida (GSH), ubiquinona e ácido úrico, ou obtidas da alimentação, como vitamina C⁸. Assim, a GSH é um importante antioxidante celular, que atua através de um ciclo redox,

prevenindo danos oxidativos⁹.

Evidências apontam a relação entre o EO e a inflamação, uma vez que este causa a desregulação do sistema imune e pode desencadear danos em organelas celulares, através do estímulo de vias de sinalização como o NFkB, que ativa células imunes fagocitárias promovendo a geração de espécies reativas. Além disso, o processo inflamatório agudo desencadeia os efeitos nocivos a células do organismo através da perda do equilíbrio redox e indução da peroxidação lipídica, o que leva ao EO^{10,11}.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) que já foi detectada em tecidos não neuronais, como em células imunes, onde exerce efeito anti-inflamatório através da regulação negativa da expressão e secreção de citocinas pro-inflamatórias¹². Neste contexto, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise de ACh em ácido acético e colina, tem sido discutida como um possível marcador do estado inflamatório celular, pois o aumento da AChE em células imunes, como os linfócitos, aumenta a hidrólise de ACh, acarretando na sua ausência ou redução de suas propriedades anti-inflamatórias, contribuindo para a indução e/ou manutenção da inflamação periférica^{13,14}. Neste âmbito, estudo prévio demonstrou que uma única injeção de LPS aumenta a atividade da AChE no sistema nervoso de camundongos, sugerindo uma relação entre a inflamação séptica e a modulação da atividade da AChE¹⁵. No entanto, não foram encontrados estudos na literatura mostrando se este efeito é também observado em células imunes periféricas.

Considerando que a inflamação pode causar danos aos tecidos, e que as próprias células imunes indutoras de inflamação podem sofrer os efeitos das citocinas geradas, este estudo teve por objetivo estabelecer um modelo de inflamação aguda *in vitro* em células imunes periféricas pela exposição ao LPS, a fim de avaliar se o ambiente inflamatório gerado através de um produto bacteriano é capaz de, em curto período, modular positivamente a atividade da AChE e induzir alterações oxidativas.

MATERIAIS E MÉTODOS

População amostral

A população amostral do estudo incluiu nove indivíduos saudáveis, quatro homens e cinco mulheres, com média de idade de 30 ± 9 anos, selecionados de forma aleatória entre colaboradores e/ou estudantes de uma Universidade do Sul do Brasil, que concordaram em participar do estudo de maneira voluntária. Os participantes voluntários da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A coleta do material biológico foi realizada no Laboratório de Experimentação e Pesquisa em Saúde da Universidade de Cruz Alta (LAEPS-UNICRUZ) por profissional habilitado para realização de coleta sanguínea. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética Institucional sob parecer 4.500.964.

Os critérios de inclusão do estudo foram: ter entre 18 e 40 anos, aceitar participar do estudo e assinar o TCLE. Os critérios de exclusão foram: ter doença inflamatória crônica ou doença inflamatória aguda nos últimos 30 dias, ter sido exposto a agrotóxicos e ter feito uso de medicamentos anti-inflamatórios ou anticolinérgicos nos últimos 30 dias.

Material biológico

Para a realização do estudo, foram coletados 20 mL de sangue venoso periférico suplementado com anticoagulante heparina. Após a coleta da amostra, foi realizado o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em Gradiente *Hystopaque 1077* (Sigma Aldrich, EUA), conforme instruções do fabricante.

Indução *in vitro* de inflamação

Para a indução *in vitro* da inflamação, as PBMC isoladas de cada indivíduo foram divididas em seis grupos de 3×10^6 células, as quais foram incubadas a 37°C, em banho-maria, por uma, três e seis horas em meio de cultura RPMI1640 com 10% de soro fetal bovino, suplementado ou não com 100 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, EUA)¹⁶. Desta forma, as PBMC não expostas ao LPS foram consideradas como controle do experimento.

Considerando que o evento inicial da ativação inflamatória é a fosforilação de NFκB, a detecção de fosforilação da subunidade p65 do NFκB foi realizada no tempo de uma hora de incubação. Por outro lado, considerando que o tempo de secreção de citocinas por PBMC incubadas com LPS inicia entre duas e quatro horas após o estímulo inicial¹⁷, a determinação da atividade da AChE e dos marcadores oxidativos (grupamentos tiólicos não proteicos e peroxidação lipídica) foram realizados nos tempos de incubação de três e seis horas.

Quantificação da fosforilação de NFκB

Para a análise da fosforilação da subunidade p65 do NFκB, $0,5 \times 10^6$ PBMC foram fixadas e permeabilizadas utilizando tampão *Perm/Fix Buffer* (BD Biosciences, EUA) pelo tempo de 40 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com o tampão *Perm/Wash Buffer* (BD Biosciences) e ressuspendidas em 100 μL do mesmo tampão. Aos 100 μL de tampão *Perm/Wash Buffer* foi acrescentado 5 μL de anticorpo anti-p65 NFκB FITC (BD Biosciences, EUA), sendo posteriormente incubado por 60 minutos na temperatura de 4°C. Após esse processo, as células foram lavadas e ressuspendidas em 300 μL do tampão *Perm/Wash Buffer* (BD Biosciences). Foram adquiridos e analisadas vinte mil eventos em citômetro de fluxo BD *Accuri C6 Plus* (BD Biosciences, EUA). Os dados foram expressos em porcentagem (%) de células positivas para p65 NFκB.

Determinação dos grupamentos tiólicos

Os grupamentos tiólicos foram quantificados, conforme Boyne e Elman (1972)¹⁹, através da redução de ácido 5,5'-ditio (bis-*itrobenzóico*) (DTNB) em pH 7,0. Posteriormente, a reação foi lida em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteína.

Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com base no método descrito por Stocks e Dormandy (1971)²⁰. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, através da leitura em 532 nm, utilizando como padrão a curva com diferentes concentrações de Malondialdeído. Os resultados foram expressos por nmol MDA/mg de proteína.

Determinação da AChE

A atividade da enzima AChE foi determinada em 1×10^6 PBMC de acordo com WOREK *et al.*, (1999)¹⁸. Para isso, as células foram lisadas com solução contendo Triton X-100. Posteriormente, o homogenato de células foi incubado com tampão fosfato e DTNB por 10 minutos a 37°C. Finalmente, adicionou-se a ACh para determinar a reação cinética em espectrofotômetro no comprimento de onda de 436 nm. Os dados foram expressos em AChE/h/mg de proteína.

Determinação de proteínas totais

As proteínas foram dosadas seguindo o método de Lowry modificado (PETERSON, 1977)²¹, sendo utilizado como padrão uma curva de diferentes concentrações de albumina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

Análise estatística

A fim de verificar a normalidade na distribuição dos dados em cada variável, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar PBMC expostas ou não ao LPS, em cada tempo de incubação testado, foram usados Teste T de Student para dados paramétricos e Teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para comparar os tempos de incubação de 3 e 6 horas, no mesmo grupo de exposição, foi realizado o Teste de Wilcoxon para os dados não-paramétricos. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Inicialmente, as PBMC foram expostas, *in vitro*, a 100 ng/mL de LPS por uma hora, para avaliar a ativação de NFkB como marcador de indução da inflamação. Neste âmbito, foi detectado aumento estatisticamente significativo na fosforilação da subunidade p65 de NFkB nas PBMC expostas ao LPS em relação ao grupo controle (não exposto ao LPS), sugerindo que o LPS ativou os mecanismos inflamatórios esperados no modelo proposto (Figura 1).

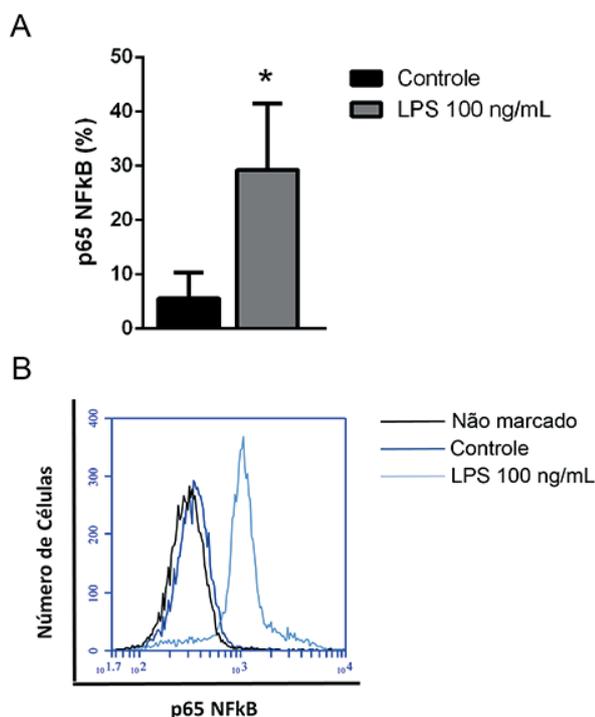


Figura 1: Ativação de NFkB em PBMC expostas *in vitro* ao LPS. (A) Detecção da subunidade p65 do NFkB nas PMBC expostas ao LPS. (B) Histograma representativo da ativação da subunidade p65 NFkB nas PBMC expostas *in vitro* ao LPS, avaliado pela técnica de *phosflow*. Dados representados pela média e desvio padrão e avaliados pelo teste T Student, * $p < 0,05$, $n = 9$. LPS: lipopolissacarídeo.

Posteriormente, foram quantificados os níveis de grupamentos tiólicos totais, como marcador de defesa antioxidante (Figura 2). Não houve diferença estatisticamente significativa nos grupamentos

tiólicos totais nas PBMC incubadas por três horas. No entanto, houve diminuição estatisticamente significativa nos grupamentos tiólicos totais nas PBMC incubadas por seis horas com LPS em relação ao grupo controle (não exposto ao LPS). Além disso, no grupo de exposição ao LPS, houve diminuição estatisticamente significativa nos grupamentos tiólicos totais nas PBMC incubadas por seis horas em relação ao grupo de PBMC incubadas por 3 horas. Associados, estes dados indicam o consumo das defesas antioxidantes celulares ao longo do tempo.

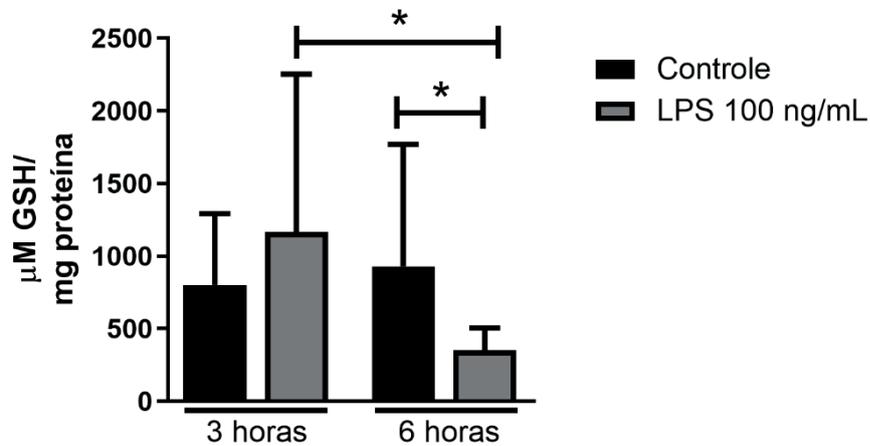


Figura 2: Grupamentos tiólicos totais em PBMC expostas *in vitro* ao LPS. Dados representados através de média e desvio padrão, diferenças estatisticamente significativas avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney (grupo controle *versus* grupo exposto ao LPS) ou pelo Teste de Wilcoxon (grupo 3 horas *versus* grupo 6 horas), * $p < 0,05$, $n = 9$. GSH: glutatona reduzida, LPS: lipopolissacarídeo.

Como houve consumo das defesas antioxidantes, foi quantificado também o nível de peroxidação lipídica como marcador de dano oxidativo a macromoléculas (Figura 3). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de exposição estudados, indicando que os tempos de inflamação testados neste trabalho não foram suficientes para induzir peroxidação lipídica.

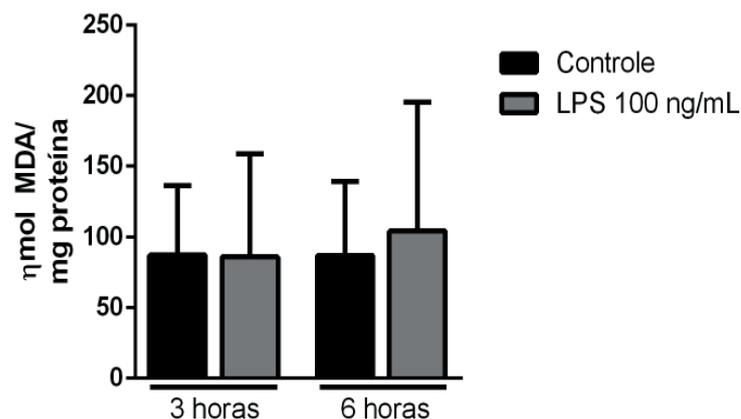


Figura 3: Peroxidação lipídica em PBMC expostas *in vitro* ao LPS. Dados representados através de média e desvio padrão, dados avaliados pelo teste U de Mann-Whitney (grupo controle *versus* grupo exposto ao LPS) ou pelo Teste de Wilcoxon (grupo 3 horas *versus* grupo 6 horas). MDA: malonaldeído, LPS: lipopolissacarídeo, $n = 9$.

Por fim, foi realizada a avaliação da atividade da AChE a fim de verificar se a ativação inflamatória por LPS é capaz de modular a atividade desta enzima nas PBMC (Figura 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e tempos testados (3 e 6 horas de exposição).

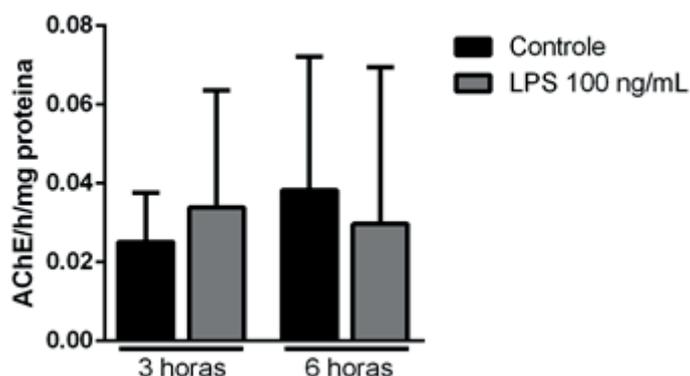


Figura 4: Atividade da enzima AChE nas PBMC expostas ao LPS. Dados representados através de média e desvio padrão, dados avaliados pelo teste U de Mann-Whitney (grupo controle *versus* grupo exposto ao LPS) ou pelo Teste de Wilcoxon (grupo 3 horas *versus* grupo 6 horas), n=9.

DISCUSSÃO

Neste estudo, validamos nosso modelo de inflamação através da detecção da fosforilação aumentada de NFkB no grupo de PBMC expostas ao LPS. Neste contexto, a ligação de LPS ao TLR-4 leva a ativação do NFkB, que está associado a transcrição de genes pró-inflamatórios, gerando um ambiente inflamatório *in vitro*^{22,23}. Assim, a fosforilação de NFkB como marcador inflamatório tem sido detectada em diversos estudos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Em um estudo realizado *in vivo* em camundongos, a injeção intraperitoneal e intracerebroventricular de LPS por sete dias ativou a fosforilação da subunidade p65 do NFkB e secreção de citocinas inflamatórias no hipocampo cerebral²³. Em outro modelo *in vitro* utilizando células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (H292) e células monocíticas humanas (THP-1), estimuladas com diferentes concentrações de LPS nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas, constatou o aumento da atividade do NFkB, marcada pelo aumento na fosforilação da subunidade p65, e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias²⁴. Estes dados indicam que a ativação de NFkB é essencial para a indução da inflamação, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Além da indução de inflamação, o LPS pode induzir efeitos tóxicos nas células por gerar altos níveis de ERO nas células, ocasionando o EO através da perda do equilíbrio redox e causando danos a macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios⁸. À vista disso, foram avaliados os níveis de compostos tiólicos totais (dentre os quais está a GSH) e a peroxidação lipídica, como marcadores de EO.

Ao que se refere a GSH, foi possível observar que não houveram alterações significativas no tempo de incubação de três horas, entretanto, houveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de incubação de 6 horas, que apresentou baixos níveis de GSH, sendo possível relacionar seu consumo ao desenvolvimento do EO nas células. A GSH é utilizada como marcador de EO por ser um importante antioxidante endógeno que participa diretamente na neutralização de radicais livres, assim como outros antioxidantes que se opõe a produção de ERO através da eliminação de radicais livres existentes afim de reparar danos induzidos por essas espécies reativas a estrutura celular²⁵.

Alguns estudos na literatura já relacionam a inflamação induzida por LPS com diminuição de GSH em modelos animais. Neste contexto, a injeção de LPS de *Escherichia coli* na veia da cauda de camundongos induz diminuição significativa dos níveis sanguíneos de GSH após cinco horas²⁶. Além disso, a injeção intraperitoneal de LPS em camundongos levou a diminuição significativa de GSH, sem ter alterado aos níveis de peroxidação lipídica²⁷. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo e reforçam a GSH como um marcador de defesa antioxidante que pode ser consumido

no EO induzido pela inflamação.

Apesar da redução nos níveis de compostos tiólicos, não foi possível detectar aumento de peroxidação lipídica neste modelo de exposição ao LPS por três e seis horas. No entanto, em estudo prévio²⁸ foi demonstrado que a exposição de PBMC a 1mg/mL de LPS por 24 horas induz peroxidação lipídica, o que sugere, juntamente com estes dados, que a inflamação induzida por LPS aumenta as espécies reativas, as quais são neutralizadas pela GSH, acarretando o seu consumo e consequente redução nas células. Uma vez que as espécies reativas estão sendo neutralizadas, não estão interagindo e danificando os lipídios celulares. Entretanto, com o passar do tempo e o progressivo consumo e esgotamento das defesas antioxidantes, os níveis de radicais livres aumentam e causam danos moleculares, como a peroxidação lipídica. Desta forma, constatou-se que o tempo de até seis horas de inflamação não seria suficiente para indução de peroxidação lipídica nas PBMC.

Nos últimos anos, a atividade da enzima AChE tem sido proposta como um marcador de doenças inflamatórias¹⁴. Neste contexto, estudos tem demonstrado que a atividade da AChE em leucócitos está aumentada em doenças como Alzheimer, diabetes, hipertensão e hiperlipidemias¹⁴. Em relação a inflamação séptica, em um estudo com ratos adultos nos quais foi administrado LPS intracerebroventricular (6,25 µg, 12,5 µg, 25 µg e 50 µg), foi demonstrado que após 24 horas, a atividade da AChE no cérebro aumentou significativamente na concentração de 50 µg de LPS injetado²⁷. Este aumento de AChE impacta na redução de ACh, uma molécula anti-inflamatória, auxiliando na manutenção do ambiente inflamatório no cérebro²⁷.

Diferente do trabalho de TYAGI *et al.*, (2008)²⁹, não foi detectado diferenças significativas na atividade da AChE em PBMC expostas ao LPS por três e seis horas. Especula-se que o tempo inicialmente proposto não é suficiente para induzir efeitos na referida enzima, ou que as PBMC não respondem da mesma maneira do que o cérebro frente ao estímulo inflamatório de LPS. Não foram encontrados outros estudos na literatura explorando o efeito do LPS sobre a atividade da AChE em PBMC.

Uma vez que a ACh inibe a produção de citocinas inflamatórias, sugere-se que é positivo para o organismo que a inflamação aguda por LPS não module a AChE. Isto porque, o aumento da atividade da AChE resultaria em hidrólise de ACh, reduzindo sua ação anti-inflamatória, o que poderia contribuir para a geração de uma inflamação exacerbada que pode ser deletéria. Por outro lado, a diminuição da AChE resultaria em acúmulo de ACh no organismo, podendo diminuir a inflamação necessária para a contenção de uma infecção.

CONCLUSÕES

Foi detectado um desequilíbrio redox nas PBMC expostas ao LPS por seis horas, através da diminuição de GSH, confirmando a hipótese de que a inflamação gerada por produtos bacterianos pode causar desequilíbrio redox nas próprias células produtoras de citocinas e mediadores inflamatórios. Apesar da detecção de diminuição das defesas antioxidantes, seis horas de incubação não foram suficientes para geração do dano oxidativo. Além disso, não foi detectada modulação da atividade da AChE, sendo que esta não pode ser utilizada como um marcador de inflamação no modelo induzido por LPS neste estudo. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidar o papel do LPS na indução de estresse oxidativo.

Contribuição dos autores

ALT: Concepção e planejamento do estudo; execução dos experimentos em laboratório; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

SRA: Concepção e planejamento do estudo; execução dos experimentos em laboratório; redação do

manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

KRC: Execução dos experimentos em laboratório; análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

IKS: Execução dos experimentos em laboratório; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

KCG: Execução dos experimentos em laboratório; análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

VCKN: Análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

JWB: Análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

GBA: Execução dos experimentos em laboratório; análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

MMP: Concepção e planejamento do estudo; execução dos experimentos em laboratório; análise e interpretação dos dados; redação do manuscrito; revisão crítica e aprovação da versão final.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018 May;11(5):627-635. doi: 10.14202/vetworld.2018.627-635
2. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6978936. doi: 10.1155/2016/6978936.
3. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Feb;290(2):G377-85. doi: 10.1152/ajpgi.00147.2005
4. Nair S, Sobotka KS, Joshi P, Gressens P, Fleiss B, Thornton C, et al. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and *in vivo*. *Glia*. 2019 Jun;67(6):1047-1061. doi: 10.1002/glia.23587.
5. Cheng N, Liang Y, Du X, Ye RD. Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury. *EMBO Rep*. 2018 Oct;19(10):e45517. doi: 10.15252/embr.201745517.
6. Han Q, Yuan Q, Meng X, Huo J, Bao Y, Xie G. 6-Shogaol attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating PPAR- γ . *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42001-42006. doi: 10.18632/oncotarget.16719.
7. McCarthy RC, Sosa JC, Gardeck AM, Baez AS, Lee CH, Wessling-Resnick M. Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. *J Biol Chem*. 2018 May 18;293(20):7853-7863. doi: 10.1074/jbc.RA118.001949.
8. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15;482(3):419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.

9. Dąbrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Jan-Feb;26(1):155-166. doi: 10.17219/acem/43272.
10. Dehghan Shahreza. Oxidative stress, free radicals, kidney disease and plant antioxidants. *Immunopathologia Persa*, v. 3, n° 2, p. 11, 2016.
11. Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*. 2018 Aug;41(4):1115-1127. doi: 10.1007/s10753-018-0739-1.
12. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci*. 2003 Dec 26;74(6):675-96. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.037.
13. de Oliveira P, Gomes AQ, Pacheco TR, Vitorino de Almeida V, Saldanha C, Calado A. Cell-specific regulation of acetylcholinesterase expression under inflammatory conditions. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;51(2):129-37. doi: 10.3233/CH-2011-1520.
14. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. *Ann Hepatol*. 2012 May-Jun;11(3):409-11.
15. Kurach Ł, Kulczycka-Mamona S, Kowalczyk J, Skalicka-Woźniak K, Boguszczyńska-Czubara A, El Sayed N, et al. Mechanisms of the Procognitive Effects of Xanthotoxin and Umbelliferone on LPS-Induced Amnesia in Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 10;22(4):1779. doi: 10.3390/ijms22041779.
16. Gomes NE, Brunialti MKC, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, v. 43, n° 9, p. 853-858, set 2010.
17. Schildberger A, Rossmann E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:697972. doi: 10.1155/2013/697972.
18. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta*. 1999 Oct;288(1-2):73-90. doi: 10.1016/s0009-8981(99)00144-8.
19. Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*, v. 46, n. 2, p. 639-653, 1972.
20. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol*. 1971 Jan;20(1):95-111. doi: 10.1111/j.1365-2141.1971.tb00790.x.
21. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977 Dec;83(2):346-56. doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4.
22. Somensi N, Rabelo TK, Guimarães AG, Quintans-Junior LJ, de Souza Araújo AA, et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol*. 2019 Oct;75:105743. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105743.
23. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep*. 2019 Apr 8;9(1):5790. doi: 10.1038/s41598-019-42286-8.
24. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF-κB, STAT3 or AP-1 activation. *Mol Med Rep*. 2018 Apr;17(4):5484-5491. doi: 10.3892/mmr.2018.8542.
25. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2018 Mar 1;22(1):61-66. doi: 10.5935/1518-0557.20180003.
26. Goraca A, Piechota A, Huk-Kolega H. Effect of alpha-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Mar;60(1):61-8.
27. Abdel-Salam OM, Salem NA, Hussein JS. Effect of aspartame on oxidative stress and monoamine

neurotransmitter levels in lipopolysaccharide-treated mice. *Neurotox Res.* 2012 Apr;21(3):245-55. doi: 10.1007/s12640-011-9264-9.

28. Bułdak Ł, **Łabuzek** K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, et al. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol Rep.* 2014 Jun;66(3):418-29. doi: 10.1016/j.pharep.2013.11.008.
29. Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. *J Neuroimmunol.* 2008 Dec 15;205(1-2):51-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.08.015.