

EFEITO DE UM DERIVADO QUINOLÍNICO FRENTE O DÉFICIT COGNITIVO E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INDUZIDOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

CRISTIAN MARTINI¹; MARIANA G. FRONZA², RODOLFO S. S. BALDINOTTI², JENIFER FETTER²; MANOELA SACRAMENTO⁴; LUCIELLI SAVEGNAGO³

¹Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas – cristianmartinibiotec@gmail.com

²Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas – nanaa.fronza@gmail.com, rodolfotga@hotmail.com, jenifer.fetter@gmail.com

³Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

⁴Laboratório de síntese orgânica limpa da Universidade Federal de Pelotas – manoeelasacramento@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa progressiva que constitui a forma mais prevalente de demência relacionada a idade (PRATICO; TROJANOWSKI, 2000). Dentre as hipóteses etiológicas da DA, a hipótese neuroinflamatória pressupõe que perda sináptica e a neurodegeneração características da doença, estão relacionadas a inflamação decorrente da deposição de placas senis (PS) e emaranhados neurofibrilares (ENF) no cérebro (SERENIKI *et al*, 2008)

Nesse sentido, a neuroinflamação crônica tem demonstrado ser um importante fator de risco para o desenvolvimento da DA, além de estar envolvida nos estágios iniciais da doença (MILLINGTON *et al.*, 2014; BAGYINZKY *et al.*, 2017). Como consequência desses processos inflamatórios, está a ativação da microglia, contudo a tentativa de degradar os agregados proteicos, resulta no aumento da liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), assim contribuindo com a morte celular e consequente neurodegeneração (HOEIJMAKERS *et al.*, 2016)

Para isso, o lipopolissacarídeo (LPS), um dos principais componentes da membrana externa de bactérias gram-negativas, tem sido amplamente utilizado para mimetizar a DA em camundongos (LEE, J. W *et al*, 2008). Visto que, a inflamação crônica induzida por LPS, é capaz de aumentar a expressão de marcadores fisiopatológicos da DA como β -amilóide ($A\beta$), tau hiperfosforilada e β -secretase (BACE-1) e ainda conduzir a disfunção sináptica e déficit de memória (MILLINGTON *et al.*, 2014).

Embora, a DA represente um dos principais problemas de saúde pública no mundo, ainda não há fármacos eficazes disponíveis para seu tratamento. Dessa maneira, a molécula 1-(7-cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA) já demonstrou efeito protetor no dano cognitivo em animais modelo de DA através da indução por estreptozotocina (FRONZA, 2017). Esse efeito foi atribuído a modulação da cascata amiloidogênica, estresse oxidativo e a disfunção colinérgica.

Nessa perspectiva, devido as características promissoras já apresentadas pela QTC-4-MeOBnA, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da molécula em reverter o dano cognitivo e formação de espécies reativas, decorrente da inflamação sistêmica induzida por LPS em camundongos.

2. METODOLOGIA

O composto QTC-4-MeOBnA foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da UFPel e dissolvido em óleo de canola (veículo) para administração na dose de 0,1 ou 1 mg/Kg, pela via intragástrica (figura 1).

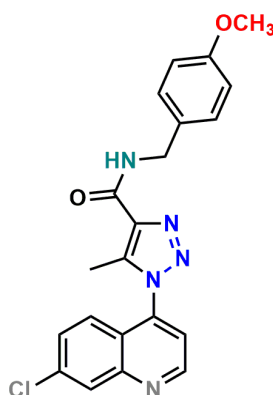


Figura 1: Estrutura química do QTC-4-MeOBnA

Foram utilizados camundongos machos swiss obtidos do Biotério Central da UFPel e mantidos em condições controladas de temperatura, ciclo claro-escuro e ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 2514-2018).

Os animais foram separados em 6 grupos experimentais e submetidos ao protocolo demonstrado no esquema abaixo (figura 2). Utilizou-se camundongos diferentes para os ensaios comportamentais e bioquímicos

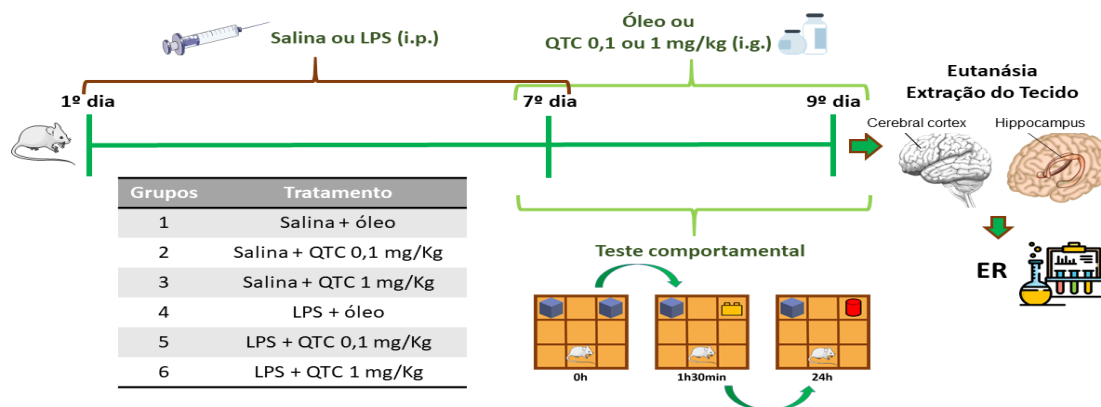


Figura 2. Delineamento experimental do protocolo de tratamento e indução. Abreviações: LPS: Lipopolissacarídeo; QTC: QTC-4-MeOBnA; ER: Espécies reativas, i.p: intraperitoneal; i.g: intragástrica.

Os animais receberam injeções intraperitoneais de LPS (*Escherichia coli* 0127:B8) (250 µg/Kg) durante 7 dias, a fim de reproduzir uma condição de inflamação. Do dia 7 ao dia 9, realizou-se a administração da QTC-4-MeOBnA (0,1 ou 1 mg/Kg) ou óleo de canola pela via intragástrica (i.g.).

Para avaliação da atividade cognitiva dos animais, o teste de reconhecimento foi realizado seguindo o protocolo de Rosa *et al* (2003). O teste é dividido em 2 etapas principais, avaliando a memória de curto e longo prazo, através da apresentação de objetos idênticos, posteriormente substituídos por objetos novos. O tempo de interação do animal com o objeto familiar (TF) e novo (TN) foi cronometrado durante períodos de 5 minutos e expresso através do índice

de reconhecimento de objetos (IRO) - [tempo gasto no objeto novo/ (tempo gasto no objeto familiar + o tempo gasto no objeto novo)].

Posteriormente, os animais foram submetidos a eutanásia e a extração do córtex total e hipocampo para realização do ensaio da formação das espécies reativas (ER's) seguindo o protocolo de Loethutinat *et al* (2005). Nesse ensaio é possível mensurar as ER's intracelulares a partir da leitura do produto fluorescente gerado pela oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCHF).

Todos os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism com análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Cada coluna representa \pm desvio padrão (S.D). Resultados foram considerados significantes quando $p > 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de reconhecimento de objetos (figura 3) demonstraram que a indução com LPS foi capaz de diminuir o IRB, demonstrando assim déficit cognitivo e de memória. O tratamento com o QTC-4-MeOBnA (1 mg/Kg) aumentou os índices de reconhecimento quando comparados ao grupo LPS, tanto na memória de curto (3A) e longo prazo (3B). Esses resultados demonstram a capacidade de reverter o declínio cognitivo induzido pela administração sistêmica de LPS.

O ensaio da formação das espécies reativas (figura 4) demonstrou que a administração de LPS foi responsável por um aumento na produção de ER's nas estruturas de córtex e hipocampo. O tratamento com QTC-4-MeOBnA (1 mg/Kg) diminuiu os níveis de ER's intracelular quando comparados com o grupo LPS, em ambas as estruturas testadas, demonstrando assim capacidade antioxidante da molécula.

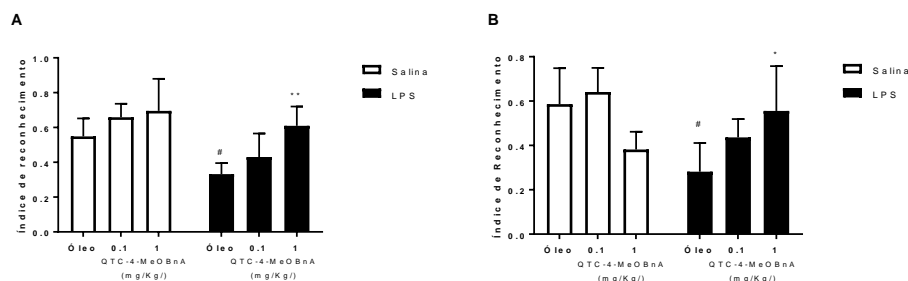


Figura 3: Efeito da QTC-4-MeOBnA (0,1 ou 1 mg/Kg) no teste do reconhecimento de objetos. (A): memória de curto prazo, (B): memória de longo prazo. Dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism com análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Cada coluna representa \pm desvio padrão (D.P). # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle e * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo LPS.

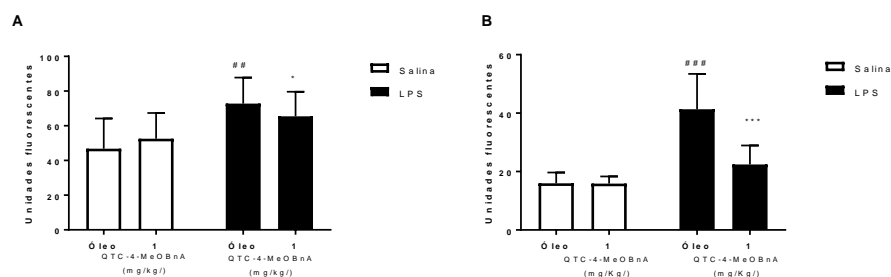


Figura 4: Efeito do QTC-4-MeOBnA (1 mg/Kg) no ensaio da formação das espécies reativas.

espécies reativas ER's. (A): córtex total, (B): hipocampo. Dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism com análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Cada coluna representa \pm desvio padrão (S.D). ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle e * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo LPS.

4. CONCLUSÕES

Partindo do exposto, o trabalho presente avaliou a capacidade da molécula QTC-4-MeOBnA em reverter o dano cognitivo e formação de espécies reativas, decorrente da inflamação sistêmica induzida por LPS em camundongos. Levando-se em consideração a diminuição do dano cognitivo e os níveis de ER's induzido pela inflamação, estima-se que a molécula desempenhou sua atividade atuando em marcadores patológicos do Alzheimer esporádico como o dano oxidativo.

Deste modo a QTC-4-MeOBnA demonstra potencial para futuras abordagens terapêuticas no tratamento da doença de Alzheimer, porém mais estudos são necessários para melhor entendimento dos mecanismos de ação da molécula.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ROSA *et al.* Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neuroscience Letters**, Porto Alegre, v. 341, p. 217-220, 2003.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, 2008.

LEE, J. W *et al.* Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, p. 1-14, 2008.

PRATICO, D.; TROJANOWSKI, J. Q. Inflammatory hypotheses: novel mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration and new therapeutic targets. **Behav Pharmacol**, v. 21, p. 441-445, 2000.

LOETCHUTINAT *et al.* Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant. **Radiation physics and chemistry**, 72, 323-331, 2005.

FRONZA, M. G. **Desenvolvimento racional de fármaco multi-alvo em modelos de Doença de Alzheimer: uma análise in silico, in vitro e in vivo**. 2017. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). Programa de pós-graduação em biotecnologia PPGB. Universidade federal de Pelotas.

MILLINGTON C, *et al.* Chronic Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: New Perspectives on Animal Models and Promising Candidate Drugs. **BioMed Research International**. 2014.

BAGYINZKY E, *et al.* Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. **Journal of Neurological Sciences** Netherlands; 376:242-54, 2017.

HOEIJMAKERS, L *et al.* Microglial Priming and Alzheimer's Disease: A Possible Role for (Early) Immune Challenges and Epigenetics, **Frontiers in Human Neuroscience**. Vol. 10, 2016.