

QTC-4-MeOBnA REVERTE A NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

JENIFER FETTER¹; MARIANA G. FRONZA²; RODOLFO BALDINOTTI²; SUZAN G. ROSA³; MANOELA SACRAMENTO²; LUCIELLI SAVEGNAGO⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas - jenifer.fetter@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – nanaa.fronza@gmail.com; rodolfotga@hotmail.com; manuelasacramento@hotmail.com;

³ Universidade Federal de Santa Maria – suzanrosa@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas - lucielisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Tem sido discutido que o processo neuroinflamatório crônico está envolvido na origem e progressão de distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos. Nesse sentido, o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina proveniente da membrana celular de bactérias Gram-negativas, provoca uma potente inflamação sistêmica, que quando ocasionada de maneira persistente culmina em neuroinflamação (ERNST, 2018).

Evidências sugerem que o LPS estimula a microglia e os astrócitos a ativarem as vias de inflamação como os receptores toll-like (TLKR) que ativam a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB). Quando isso ocorre o complexo quinase IκB (IKK) é ativado levando a fosforilação do IκB e consequente translocação e liberação do NF-κB para o núcleo, provocando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator nuclear tumoral alfa (TNFα) (SNOW; ALBENSI, 2016).

Além disso, a inflamação sistêmica pode levar ao rompimento da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e consequente o aumento de sua permeabilidade. Com isso, a função da BHE é alterada ocasionando em estresse oxidativo e neuroinflamação (BANKS et al., 2015). Esse processo tem sido diretamente relacionado com a disfunção sináptica, dano cognitivo e neurodegeneração, características da Doença de Alzheimer (DA) (BOSTANCIKLIOĞLU, 2019). Nesse sentido, devido a ausência de terapias eficazes disponíveis para o tratamento da DA, a modulação de vias inflamatórias e restauração da permeabilidade da BHE podem ser um alvo terapêutico interessante para a sua resolução.

Interessantemente, a molécula 1-(7-cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA) foi racionalmente desenvolvida para modular alvos terapêuticos da DA. A QTC-4-MeOBnA apresentou capacidade de reverter as características da DA, como a reversão do declínio cognitivo e de memória induzido por estreptozotocina em camundongos e a regulação do estresse oxidativo através da restauração da expressão dos genes fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em camundongos induzidos por injeção de escopolamina.

Portanto, tendo em vista o que foi exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da QTC-4-MeOBnA no declínio da memória provocado pela injeção de LPS através da avaliação da integridade da BHE e modulação das cascatas inflamatórias.

2. METODOLOGIA

Para realização dos estudos, foram utilizados camundongos Swiss machos (n:8), submetidos a condições padrão de alojamento. O protocolo experimental (Figura 1) foi iniciado com a injeção de LPS (*Escherichia coli* 0127:B8) pela via intraperitoneal, na dose de 250 µg/Kg durante sete dias. Em seguida foi

administrado pela via intragástrica a molécula QTC-4-MeOBnA (Figura 1A) a qual foi sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas, na dose de 0,1 e 1 mg/Kg durante três dias ou seu veículo óleo de canola. No 9º dia foi realizado o teste comportamental do labirinto em Y e posteriormente a região cerebral de hipocampo foi isolada para a realização das análises bioquímicas. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA 2514-2018).

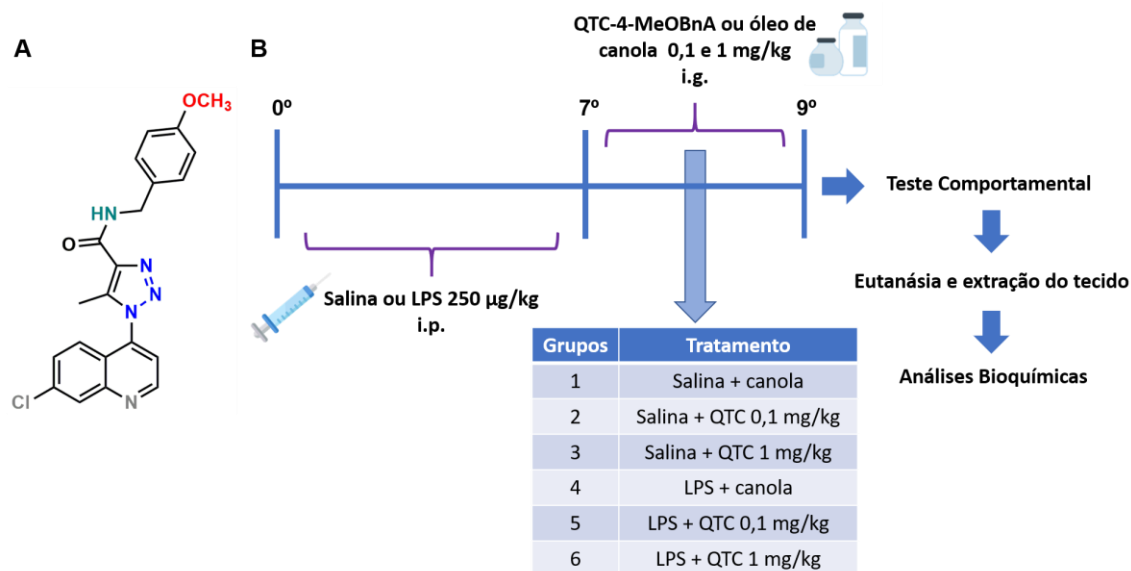


Figura 1. (A) estrutura química do 1-(7-cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA) e (B) esquema do protocolo experimental. Abreviações: i.p.: intraperitoneal; i.g.: intragástrica; LPS: lipopolissacarídeo

A memória espacial e de trabalho foi avaliada através do teste comportamental do labirinto em Y, descrito por SARTER et al. (1988), que consiste em colocar os camundongos individualmente em um dos braços do labirinto em Y e então é avaliado o número de entradas em sequência nos braços durante 6 minutos.

Com o intuito de dosar os níveis proteicos do NF- κ B e de sua via de sinalização, foi realizada a técnica de *Western Blot*. As amostras de proteína pré-coradas foram separadas utilizando a eletroforese em gel de SDS-PAGE. Em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência Transfer-Blot® Turbo™. Depois de bloquear com uma solução de albumina de soro bovino, a membrana foi incubada *overnight* com os anticorpos primários (IKK, IKKB, NF- κ B e TNF α). Após as lavagens as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários marcados com peroxidase. A densidade óptica (DO) das bandas de Western blotting foi quantificada usando o software Imagem J.

Para avaliar a permeabilidade da BHE, foi injetado pela via intraperitoneal uma solução de 2% de Evans Blue em salina nos camundongos (MANAENKO et al., 2011). Depois de 3 horas, sob anestesia geral foi realizada a perfusão transcardíaca com 25 mL de salina e 25 mL de PBS para retirar o sangue circulante do cérebro e então foi extraído o cérebro total.

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 7, através da análise de variância de duas vias seguida pelo

teste de Tukey. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão e os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É sabido que o LPS causa o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, condicionando tanto ao aumento da produção de mediadores inflamatórios como o NF- κ B e o TNF α , em paralelo a migração dessas citocinas produzidas na periferia, o que intensifica a neuroinflamação e causa declínio cognitivo.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o tratamento com o QTC-4-MeOBnA reverteu o declínio cognitivo causado pela indução de LPS, como mostrado no teste do labirinto em Y (Figura 2). Além disso, o tratamento demonstrou que o QTC-4-MeOBnA reduziu os níveis de mediadores inflamatórios como o NF- κ B e o TNF α no hipocampo dos camundongos (Figura 3). Isso pode ser atribuído a restauração da integridade da BHE pela molécula, apontando seu efeito anti-inflamatório (Figura 4).

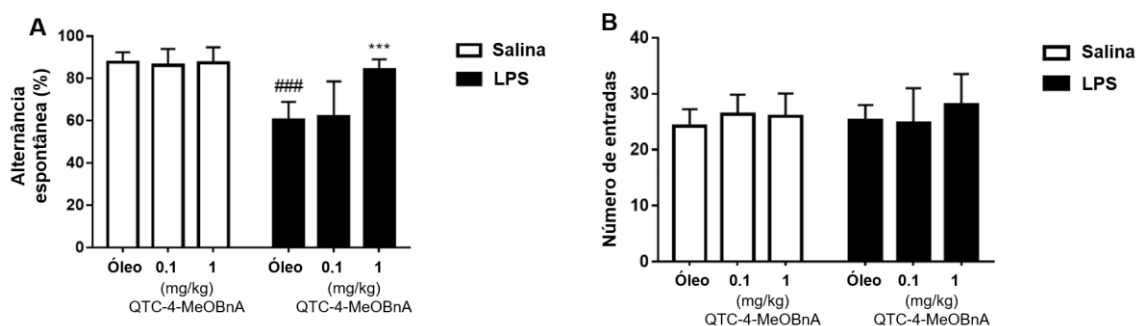


Figura 2. Efeito do QTC-4-MeOBnA no teste do labirinto em Y em camundongos induzidos por injeção LPS. Cada coluna representa média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo induzido

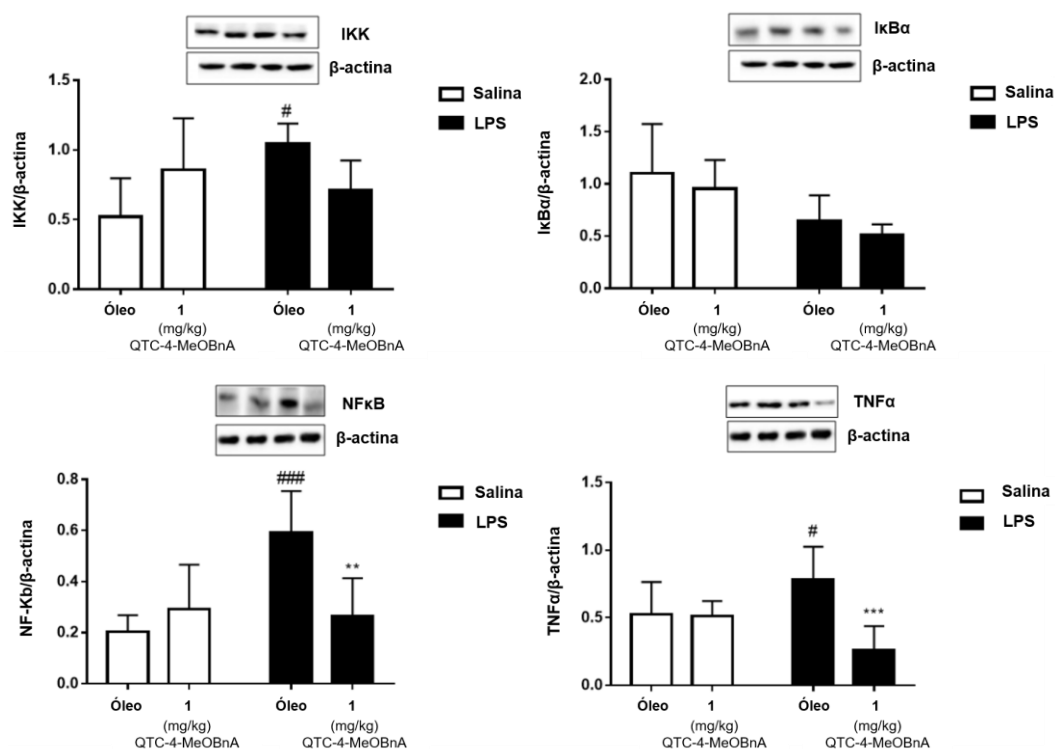


Figura 3. Efeito do tratamento com QTC-4-MeOBnA na integridade da barreira hematoencefálica em camundongos submetidos a injeção de LPS. Cada coluna representa média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. ###p < 0,001 quando comparado ao grupo controle e **p < 0,01 quando comparado com o grupo induzido

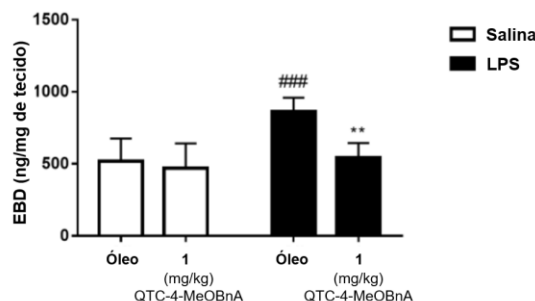


Figura 4. Efeito do tratamento com QTC-4-MeOBnA na via de sinalização do NF-Kb em camundongos submetidos a injeção de LPS. Cada coluna representa média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. #p < 0,05 e ###p < 0,001 quando comparado ao grupo controle e **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparado com o grupo induzido

CONCLUSÕES

Tendo em vista o que foi exposto, a molécula QTC-4-MeOBnA demonstrou que atua na via de sinalização de sinalização do NF- κ B e na integridade da barreira hematoencefálica, sendo capaz de reverter a neuroinflamação causada pela indução com LPS. Isso suporta que a QTC-4-MeOBnA possui um caráter multifatorial podendo agir em diversos alvos terapêuticos da DA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKS, R. et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. **Journal Neuroinflammation**. v. 12, p. 1-15, 2015.
- BOSTANCIKLIOĞLU, M. An update on the interactions between Alzheimer's disease, autophagy and inflammation. **Gene**. v. 705, p. 157-166, 2019.
- ČOLOVIĆ, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**. v. 11, p. 315-335, 2013.
- ERNST, T. R. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationship of structure to activity and function. **The FASEB Journal**. v.8, p.217-225, 2018.
- MANAENKO, A. et al. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 195, n.2, p. 206-210, 2011.
- SARTER, M. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**. v. 94, p. 491-495, 1988.
- SNOW, W.M.; ALBENSI, B.C. Neuronal Gene Targets of NF- κ B and Their Dysregulation in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 9, p. 118-137, 2016.