

EFEITO NEUROPROTETOR DE TIAZOLIDIN-4-ONA EM CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO

FERNANDO LOPEZ ALVEZ¹; TAYNÁ AMARAL VELEDA²; MAYARA SOARES DE AGUIAR³; DANIEL SCHUCH DA SILVA⁴; WILSON CUNICO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – fernando.lopez.alvez@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – taynaaveleda@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danielschuch08@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é uma resposta inflamatória celular, e consequentemente tecidual, a uma injúria no sistema nervoso central (SNC) (STEVENSON et al., 2020). Embora essa resposta esteja presente em condições agudas, como em resposta a isquemia tecidual ou traumas, ela também é presente nas patologias neurodegenerativas, de caráter crônico, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017). Assim, é importante a prospecção de compostos capazes de proteger contra as alterações decorrente de neuroinflamação (WELCOME, 2020).

As células gliais, astrócitos e micróglia desempenham um papel central na neuroinflamação, assim são um importante alvo terapêutico nesta condição. Os astrócitos destacam-se pelo papel de suporte metabólico neuronal, homeostasia do lactato e neurotransmissores, recobertura de fendas sinápticas e pela defesa tecidual quando ativados (STEVENSON et al., 2020). Após a ativação, ou reatividade, astrócitos passam por mudanças morfológicas e fisiológicas que permitem a essas células proliferarem-se, formando cicatriz glial, ou alterarem a liberação de mediadores pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017; SOFRONIEW, 2020).

As ERO são um termo que representa diversas moléculas oxidantes provenientes do metabolismo celular, que apresentam um papel danoso por oxidarem DNA e proteínas, e um papel fisiológico por induzirem a inflamação e a renovação proteica (HALLIWELL, 2006). Atualmente existem diversas correlações positivas entre o aumento de ERO e doenças neurodegenerativas, tendo feito do estado redox celular um alvo terapêutico em potencial (CHEN et al., 2020). A fim de contrapor incrementos de ERO, a célula expressa defesas antioxidantes não enzimáticas, como a glutational, e enzimáticas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD) que converte o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a catalase (CAT) converte o H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL, 2006).

A tiazolidin-4-ona é um composto heterocíclico de cinco membros contendo no anel um átomo de enxofre, um átomo de nitrogênio e um grupo carbonila, apresentando atividade biológica (KAUR MANJAL et al., 2017). Haja vista que compostos sintetizados derivados de tiazolidin-4-ona anteriormente apresentaram efeitos *in vitro* na redução de ERO, com consequente reversão de parâmetros

bioquímicos em modelo de neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS) (ALVEZ et al., 2022), e *in vivo* em modelo de amnésia por escopolamina (DA SILVA et al., 2021), o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do composto 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)thiazolidin-4-ona (DS12) nos níveis de ERO e atividade das enzimas SOD e CAT, em duas estruturas encefálicas, em um modelo *in vivo* de neuroinflamação por LPS.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA 038629/2021-13).

O composto DS12 foi sintetizado de acordo com da Silva *et al.* (2016) e posteriormente confirmado e caracterizado por CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C.

Camundongos Swiss de 60 dias, foram mantidos a temperatura constante (22 ±1 °C), ciclo de luz/escuro de 12/12 h e umidade entre 50 a 65% durante todo o experimento. Os animais foram divididos em grupos com o seguinte esquema de tratamento por 7 dias consecutivos: Controle, recebendo solução de salina via intraperitoneal (i.p.) e óleo de canola via gavagem (gv.); LPS, recebendo solução de LPS (250 µg/kg) via i.p. e óleo de canola via gv.; DS12 (5 mg/kg), recebendo LPS (250 µg/kg) via i.p. e DS12 em óleo de canola via gv.; DS12 (10 mg/kg), recebendo LPS (250 µg/kg) via i.p. e DS12 em óleo de canola via gv. Ao fim do tratamento, foi realizada a eutanásia e subsequente extração das estruturas cerebrais córtex e hipocampo.

A avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo espécies reativas de oxigênio (ERO), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), foram executados segundo Ali; Lebel e Bondy (1992), Misra e Fridovich (1972) e Aebi (1984), respectivamente. A quantidade de proteína foi dosada segundo Lowry *et al.* (1951).

Análise estatística foi realizada por ANOVA de 1 via seguido do teste de Tuckey no software GraphPad. A diferença entre grupos foi considerada significativa quando P<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, é possível observar que o tratamento com a DS12 foi capaz de proteger contra o aumento dos níveis de ERO causado pelo LPS em córtex (5 e 10 mg/kg) e hipocampo (10 mg/kg) (P<0.05, **Figura 1**). O LPS por via sistêmica pode corromper a barreira cérebro-sangue, propiciando a invasão de células periféricas, e ativar uma cascata de sinalização no astrócito que leva ao aumento da produção do fator de necrose tumoral, uma citocina pró-inflamatória, e à reatividade astrocitária (BATISTA et al., 2019; SOFRONIEW, 2020). Níveis elevados de ERO em diversas condições do SNC estão associados ao estado reativo do astrócito como o de outras células presentes no local injuriado (CHEN et al., 2020). Dessa forma, a redução de ERO pode indicar a interferência do composto na reatividade astrocitária ou da micrógliia.

E relação a atividade de SOD, em córtex foi possível observar que a administração de DS12 (10mg/kg) foi capaz de proteger contra a redução na atividade da SOD induzida pelo LPS (P<0.05, **Figura 1**). No entanto, nenhuma alteração na atividade da SOD foi observada em hipocampo (P>0.05, **Figura 1**). Apesar de ser facilmente detectada em neurônios e astrócitos do SNC de camundongos, os astrócitos apresentam uma maior quantidade da enzima SOD (LINDENAU et al., 2000). O hipocampo apresenta uma maior densidade neuronal

(aprox. 119,4 mil mm^{-3}) do que astrocítica ($\sim 12,5$ mil mm^{-3}), pouco maior de que a densidade cortical de neurônios (104,5 mil mm^{-3}) e astrócitos (11,4 mil mm^{-3}) (ERÖ et al., 2018). Isso pode indicar que o hipocampo, no presente modelo estudado, utiliza outros mecanismos de defesa antioxidante na redução dos níveis de ERO.

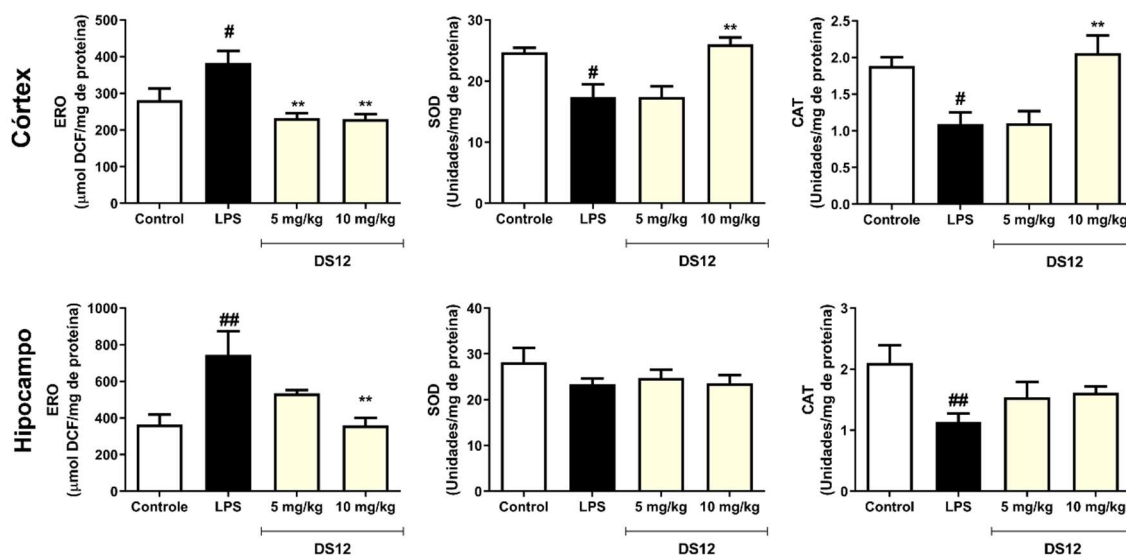


Figura 1. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em córtex cerebral e hipocampo de camundongos tratados com LPS e DS12. #, ## Estatisticamente diferente do grupo controle ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). ** Estatisticamente diferente do grupo LPS ($P < 0,01$).

É possível observar que em córtex cerebral e hipocampo o LPS é capaz de reduzir a atividade da CAT ($P < 0,05$). No entanto, no córtex cerebral, o tratamento com a DS12 (10 mg/kg) foi capaz de proteger contra esta redução ($P < 0,05$, **Figura 1**). Não obstante a célula se utilize da SOD para defender-se de $\text{O}_2^{\cdot -}$ produzido, o H_2O_2 resultante da dismutação ainda é tóxico para a célula. Logo, a CAT atua sequencialmente à SOD na linha de defesa antioxidante, especialmente no citoplasma (HALLIWELL, 2006). Dessa forma, o resultado obtido, tanto em córtex quanto em hipocampo corrobora com o resultado obtido para SOD nesses tecidos, indicando uma utilização dessas enzimas antioxidantes no córtex cerebral e uma possível utilização de outra via antioxidante no hipocampo.

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, a administração de uma tiazolidin-4-ona, 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona, na concentração de 10 mg/kg se mostrou capaz de atenuar o nível de ERO em córtex cerebral e hipocampo de camundongos. Destarte, esse composto apresenta um potencial terapêutico na neuroinflamação, por atenuação do estresse oxidativo – presente nessa resposta bem como nas doenças neurodegenerativas.

Entretanto, é preciso identificar e escrutinizar, através do estudo de outras vias antioxidativas como a glutatona, a glutatona peroxidase, entre outras enzimas e fatores, os exatos alvos celulares pelos quais essas atenuações foram atingidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.
- ALI, S.; LEBEL, C.; BONDY, S. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 13, n. 3, p. 637–648, 1992.
- ALVEZ, F. L. et al. Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide—Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. n/a, n. n/a, 15 jan. 2022.
- BATISTA, C. R. A. et al. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.
- CHEN, Y. et al. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 3, p. 1–13, 2020.
- DA SILVA, D. S. et al. Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 574–582, 2016.
- DA SILVA, D. S. et al. Multitarget Effect of 2-(4-(Methylthio)phenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)thiazolidin-4-one in a Scopolamine-Induced Amnesic Rat Model. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1554–1566, 2021.
- ERÖ, C. et al. A cell atlas for the mouse brain. **Frontiers in Neuroinformatics**, v. 12, n. November, p. 1–16, 2018.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.
- KAUR MANJAL, S. et al. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 406–423, 2017.
- LINDENAU, J. et al. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. **Glia**, v. 29, n. 1, p. 25–34, 2000.
- LOWRY, O. et al. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.
- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.
- STEVENSON, R. et al. Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. August, p. 1–23, 2020.
- WELCOME, M. O. Neuroinflammation in CNS diseases: Molecular mechanisms and the therapeutic potential of plant derived bioactive molecules. **PharmaNutrition**, v. 11, p. 100176, 2020.