

EFEITO DE UMA 4-TIAZOLIDINONA NA REATIVIDADE ASTROCITÁRIA EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS

FERNANDO ALVEZ¹; ANA S. PEREIRA²; WILSON CUNICO³, ROSELIA SPANEVELLO⁴ CLÁUDIA A. VALENTE⁵

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

²Universidade de Lisboa – aspereira@medicina.ulisboa.pt

³Universidade Federal de Pelotas – wjcunico@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

⁵Universidade de Lisboa – cvalentedecastro@medicina.ulisboa.pt

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença que acomete o sistema nervoso central (SNC) e a causa mais comum de demência, afetando milhões de indivíduos no mundo. Caracteriza-se por uma perda neuronal progressiva, traduzida para um fenótipo de indivíduo com déficits cognitivos e perda de memória. Embora a etiologia da doença não tenha sido completamente elucidada, é marcante a presença de agregados da proteína beta-amiloide (A β) e emaranhados neurofibrilares da proteína Tau, ambos relevantes para a neuroinflamação e neurodegeneração (Kim *et al.*, 2024; Lista *et al.*, 2023).

A perda de neurônios secretores de acetilcolina (ACh) presentes nos núcleos da base e a presença da enzima que hidrolisa a ACh, acetilcolinesterase (AChE), diminuem o tônus colinérgico cortical e hipocampal, evento associado à perda de memória e cognição. Apesar da evolução no entendimento dessa doença, os medicamentos comumente prescritos são os inibidores de AChE (AChEi) donepezila, rivastigmina e galantamina, visando o retorno do tônus colinérgico (Lista *et al.*, 2023).

Os astrócitos são células residentes no SNC cruciais para a homeostase e proteção do parênquima cerebral. Na progressão da DA, o parênquima é um ambiente neuroinflamado e os astrócitos reagem com alterações moleculares e morfológicas complexas (reatividade astrocitária), com potencial tanto para reparo tecidual como para a promoção da neurodegeneração (Escartin *et al.*, 2021). Na reatividade promotora de neurodegeneração, os astrócitos (designados por A1) aumentam a secreção de proteína do sistema complemento C3, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), citocinas e outros fatores que contribuem para a neurodegeneração (Kim *et al.*, 2024). Sabe-se igualmente que este fenótipo astrocítico pode ser induzido por fatores secretados por microglia pró-inflamatória (TNF α , IL-1 α e C1q) (Liddelow *et al.*, 2017).

As 4-tiazolidinonas apresentam um anel heterocíclico contendo um enxofre, um nitrogênio e uma carbonila. Esse heterociclo farmacofóro, presente no medicamento antidiabético pioglitazona, permite o direcionamento a diversos alvos terapêuticos via substituintes nesse anel (Chawla *et al.*, 2023). Uma 4-tiazolidinona, 2-(4-(metiltio)fenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)tiazolidin-4-ona (DS12), descrita como um AChEi do tipo misto, melhorou a cognição num modelo animal de DA (Da Silva *et al.*, 2020; Dos Santos *et al.*, 2023).

Este trabalho teve por objetivo analisar o impacto da DS12 sobre a reatividade astrocitária induzida em culturas puras de astrócitos por fatores indutores de reatividade A1 e pelo péptido A β .

2. METODOLOGIA

Os animais utilizados foram procedentes do laboratório Charles Rivers (Barcelona, Espanha). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas da União Europeia (2010/63/EU) e a lei portuguesa.

A síntese de DS12 foi realizada conforme descrito anteriormente (Da Silva *et al.*, 2016) e utilizada na concentração final de 100 μ M por poço.

A cultura primária purificada de astrócitos foi preparada conforme (Van Zeller; Sebastião; Valente, 2022). Córtex e hipocampo de Ratos Sprague Dawley com 2 dias de vida foram macerados, em pool de 3-4 animais, em meio de cultura Dulbecco Eagle modificado (DMEM:F-12 GlutaMax), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótica/antimicótica. Após duas filtrações (100 μ m e 70 μ m) e centrifugações, o pelet final foi ressuspensionado em 15 mL de meio por encéfalo. Em frascos de cultura T75 cobertos com poli-D-lisina (PDL, 10 μ g/mL), foram plaqueados 10 mL da suspensão final e mantidos a 37 °C, 95% CO₂ e ambiente úmido por 7 dias *in vitro* (DIV). A 7 DIV os astrócitos foram obtidos por agitação (300 rpm) e descolamento com tripsina 0,05%, e replaqueados em placas de seis poços para western blot (WB) e lamínulas de vidro para imunocitoquímica (ICC). A partir do 7 DIV foi adicionado ao meio de cultura 1 μ M de pexidartinib (PLX), para remoção das células da microglia, tendo-se realizado 4 trocas de meio até o dia da exposição aos insultos.

Ao 17 DIV as células foram expostas a: I) Controle; II) A β (A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M); III) fatores TIC (TNF α [30 ng/mL], IL-1 α [3 ng/mL] e C1q [400 ng/mL]); IV) A β + TIC, por 24 horas. Os grupos foram replicados na presença de DS12 (100 μ M).

Para o ensaio de western blot (WB), as células foram raspadas na presença de solução de lise contendo inibidores de proteases. Após raspagem, a suspensão foi sonicada, centrifugada e o lisado celular armazenado a -20 °C. A dosagem da proteína total foi realizada com um kit comercial pelo método de Lowry, Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, EUA).

As proteínas, 35 μ g por poço, foram desnaturadas a 90 °C por 10 min, separadas em géis de SDS-PAGE de 10% e 15% e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). O bloqueio foi realizado com uma solução de albumina sérica bovina 3% por 1 h. As membranas foram depois expostas durante a noite (d.n.) a 4 °C com os anticorpos primários: anti-GFAP de camundongo (1:10000, Millipore, MAB360), anti-C3 de cabra (1:500, R&D Systems, AF2655) e anti-GAPDH de camundongo (1:20000, Ambion, AM4300), e subsequentemente aos respectivos anticorpos secundários conjugados com uma peroxidase (HRP).

A intensidade de sinal foi revelada com o Western Lighting Pro ECL (PerkinElmer, EUA), captada no Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) e analisada no software FIJI.

Para o ensaio de imunocitoquímica (ICC), os astrócitos foram fixados com paraformaldeído 4% por 15 min a temperatura ambiente (TA) e mantidos em PBS a 4 °C até à realização do ensaio. Os aldeídos produzidos por degradação do PFA foram removidos com uma solução de glicina. Os astrócitos foram permeabilizados com solução de triton 0,5% por 10 min e o bloqueio decorreu à TA com FBS 10% por 1 h. As lamínulas foram expostas aos anticorpos primários, GFAP (1:400, vide WB) e Iba-1 (1:400, 819-19741, Fujifilm Wako, Japão), d.n. a 4 °C, e aos anticorpos secundários, AlexaFluor 488 anti-camundongo (1:100, A-21202, Thermo Fischer) e AlexaFluor 568 (1:100, A10042, Thermo Fischer), por 4 h, TA. Os núcleos foram corados com Hoechst (20 μ g/ml), por 5 min, e a montagem das lamínulas foi realizada com mowiol. Lavagens com PBS foram realizadas entre as várias etapas.

As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert (Carl Zeiss, Alemanha), com a objetiva de 40x e os painéis preparados através do software ZenBlue (Carl Zeiss, Alemanha).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tuckey no software GraphPad Prism 9.5. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM, do inglês *standard error of the mean*) e as diferenças significativas foram consideradas se p -value <0.05 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efetivamente a ICC não revelou células marcadas por Iba-1, comprovando a eficiência do PLX na remoção da micróglia. A morfologia de astrócitos mostrou-se distinta. Sob ação de A β , núcleos pouco corados e um rearranjo de citoesqueleto indicam reatividade astrocitária – sem reflexos nos níveis de GFAP. Exposição a TIC produziu células com citoesqueleto expandido, possivelmente produzindo hiperplasia celular; no entanto, a presença de A β parece ativar alguma via que suprime essa característica. Entretanto, a presença de DS12 100 μ M não parece impactar as morfologias observadas.

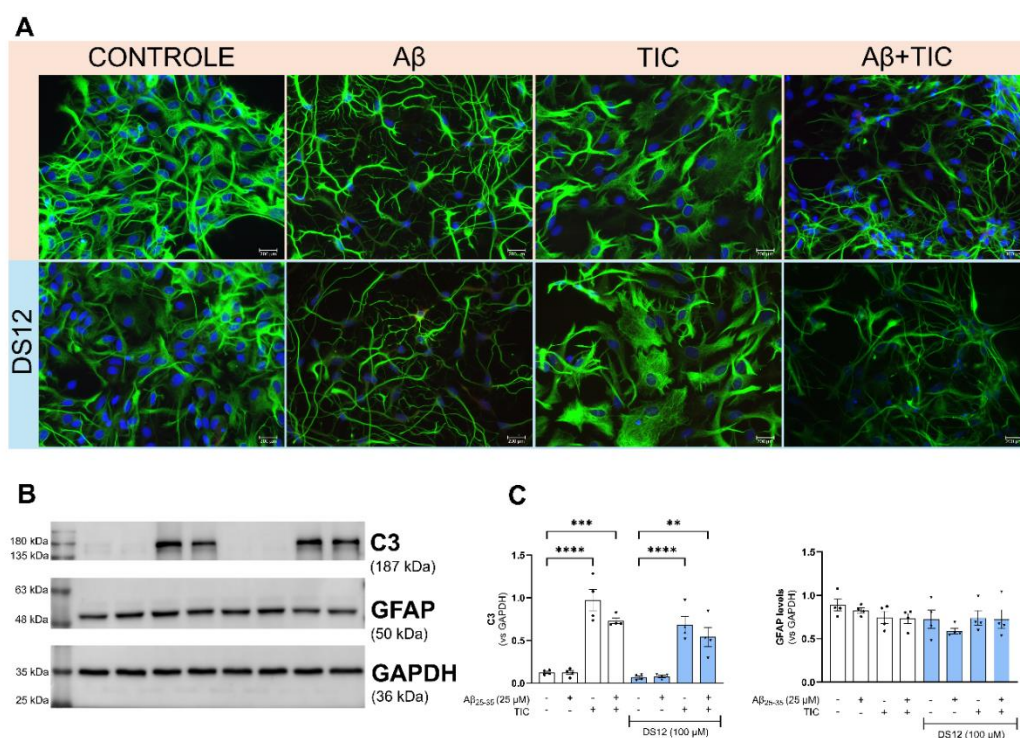


Figura 1. Efeito da DS12 Sobre Astrócitos Em Cultura Expostos a A β ₂₅₋₃₅, TIC e ambos. **(A)** Imagens representativas de GFAP (astrócitos, verde), Iba-1 (microglia, vermelho) e Hoechst (núcleos, azul) nas várias condições. Escala: 200 μ m. **(B)** Imagens representativas dos imunoblots para C3, GFAP e GAPDH em astrócitos insultados, sem ou com exposição a DS12. **(C)** A expressão proteica de C3 e GFAP foi calculada em relação ao GAPDH. Os valores estão expressos em média \pm SEM. N = 4. Análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste de Tuckey, ** p <0.01 *** p <0.001 e **** p <0.0001.

Foi observado um aumento da produção de C3 nos grupos TIC [$F_{(3,24)}=53,48$, p <0,0001, SEM \pm 0,128] e A β +TIC [$F_{(3,24)}=53,48$, p =0,0001, SEM \pm 0,034] em comparação com o controle [SEM \pm 0,014]. A presença de DS12 por 24 h, não foi

capaz de impedir a expressão dessa proteína tanto para TIC [$F_{(3,24)}=53,48$, $p=0,1347$, $SEM\pm 0,100$] como para $A\beta$ +TIC [$F_{(3,24)}=53,48$], $p=0,5972$, $SEM\pm 0,113$]. Os fatores TIC induzem um perfil reativo de astrócitos A1 e detectados em encéfalos com AD. Esses astrócitos são produtores de C3 e mostraram-se indutores da apoptose de neurônios espinais e dopaminérgicos (Liddelow *et al.*, 2017).

A expressão de GFAP como marcador de reatividade astrocitária tornou-se um tema aberto a discussão, pois, ao longo do tempo não se observou uma proporcionalidade entre insulto e a expressão de GFAP (Escartin *et al.*, 2021). Neste trabalho não foram observadas diferenças entre o controle e os grupos insultados, tanto na ausência ou presença da DS12.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a DS12 não foi capaz de reverter a expressão de C3 ou GFAP em culturas primárias de astrócitos frente ao insulto isolado ou combinado de TIC e $A\beta$. Não obstante, a reatividade astrocitária é complexa e dependente do contexto da injúria, envolvendo a expressão de outros fatores não estudados neste trabalho e a participação de células presentes no tecido *in vivo*. Efetivamente, os resultados obtidos retratam essa realidade e indicam a necessidade de estudos com outros tipos de injúrias e marcadores astrocitários.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAWLA, P. A. *et al.* Synthetic strategies and medicinal perspectives of 4-THIAZOLIDINONES: Recent developments and STRUCTURE–ACTIVITY relationship studies. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 1248–1286, 2023.
- DA SILVA, D. S. *et al.* In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 241–253, 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**, [s. l.], v. 124, p. 574–582, 2016.
- DOS SANTOS, A. *et al.* Thiazolidin-4-one prevents against memory deficits, increase in phosphorylated tau protein, oxidative damage and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease model: Comparison with donepezil drug. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 193, p. 1–10, 2023.
- ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.
- KIM, J. *et al.* Pathological phenotypes of astrocytes in Alzheimer's disease. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 95–99, 2024.
- LIDDELOW, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, [s. l.], v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.
- LISTA, S. *et al.* Determinants of approved acetylcholinesterase inhibitor response outcomes in Alzheimer's disease: relevance for precision medicine in neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 84, p. 101819, 2023.
- VAN ZELLER, M.; SEBASTIÃO, A. M.; VALENTE, C. A. Microglia Depletion from Primary Glial Cultures Enables to Accurately Address the Immune Response of Astrocytes. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 666, 2022.