

REDIRECIONAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS NO TRATAMENTO DA NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA POR INFECÇÃO VIRAL EM CULTURA PRIMÁRIA NEURONAL.

Bruna Mara Machado Ribeiro, Danielle Silveira Macedo.

NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

E-mail: bruna.ribeiro@ufc.br

Resumo do artigo: A utilização de modelos experimentais de ativação imune são ferramentas indispensáveis para confirmar a hipótese de associação entre a exposição à infecção viral, o aumento do risco de alterações neurodesenvolvimentais e o teste de novos fármacos úteis para o tratamento dos transtornos neuroinflamatórios. Este estudo foi delineado com o intuito de ampliar a compreensão e buscar determinar os possíveis efeitos neuroprotetores dos PUFA-N3 e da clozapina em cultura primária de células neuronais hipocampais submetidas a um estímulo neuroinflamatório induzido pela exposição ao vírus mimético poly I:C. O objetivo deste trabalho foi estudar os possíveis efeitos neuroprotetores do PUFA-N3 e clozapina na neuroinflamação induzida por Poly I:C em cultura primária de células neuronais hipocampais. Os neurônios do hipocampo foram incubados com PUFAs - N3 ou clozapina na presença ou ausência de poly I: C (100 µg / ml, 148,9 µM) durante 72 horas. Para avaliar a melhor concentração dos fármacos de teste, as células foram cultivadas com PUFAs – N3 em várias diluições no meio de cultura: 1: 200 (EPA 3,5 µM, DHA 2,15 µM), 1: 100 (EPA 7,1 µM, DHA 4,3 µM) e 1:50 (EPA 14,2 µM, DHA 8,6 µM) ou com clozapina (1,5 µM e 3 MM) na presença ou ausência de poly I: C e submetidos ao teste de viabilidade celular. A viabilidade celular foi avaliada pela medição da redução de MTT, onde o meio foi removido e substituído por 300 µL do reagente MTT (1 mg / mL) durante 3 horas a 37 ° C. Os seguintes parâmetros foram avaliados de acordo com as técnicas em parênteses: NFkBp50 e iNOS (imunofluorescência), NFkBp65 (imunoblot) e fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF (técnica de ELISA). O PUFA-N3 protegeu as células hipocampais primárias de lesões inflamatórias induzidas por poly I: C. Os resultados evidenciaram o envolvimento do NFkB na ação neuroinflamatória do poly I: C e sua inibição por PUFAs- N3 ou clozapina. Vale ressaltar a aparente superioridade do PUFAs- N3 comparada à ação protetora da clozapina, uma vez que somente PUFAs-N3 impediu a depleção dos níveis de BDNF induzida por poly I: C. Os resultados encontrados apontaram para o bom perfil de segurança do uso dos PUFAs-N3, até mesmo em períodos embrionários e neonatais, os efeitos da clozapina agregaram inúmeras evidências para a utilização destes fármacos como estratégias para o tratamento das consequências neuropatológicas de eventos neuroimunes precoces, tais como infecções virais, prevenindo assim o surgimento de possíveis alterações neuroinflamatórias.

Palavras-chave: Neuroinflamação, vírus, neuroproteção.

Introdução: A primeira investigação a relatar uma associação entre infecções virais e transtornos neurodesenvolvimentais foi conduzida na Finlândia (MASI *et al.*, 2003). Estes pesquisadores observaram que fetos expostos durante o segundo trimestre de gestação ao vírus da influenza A2, na epidemia de 1957, apresentavam risco mais elevado para desenvolvimento de alterações neuropsiquiátricas na vida adulta.

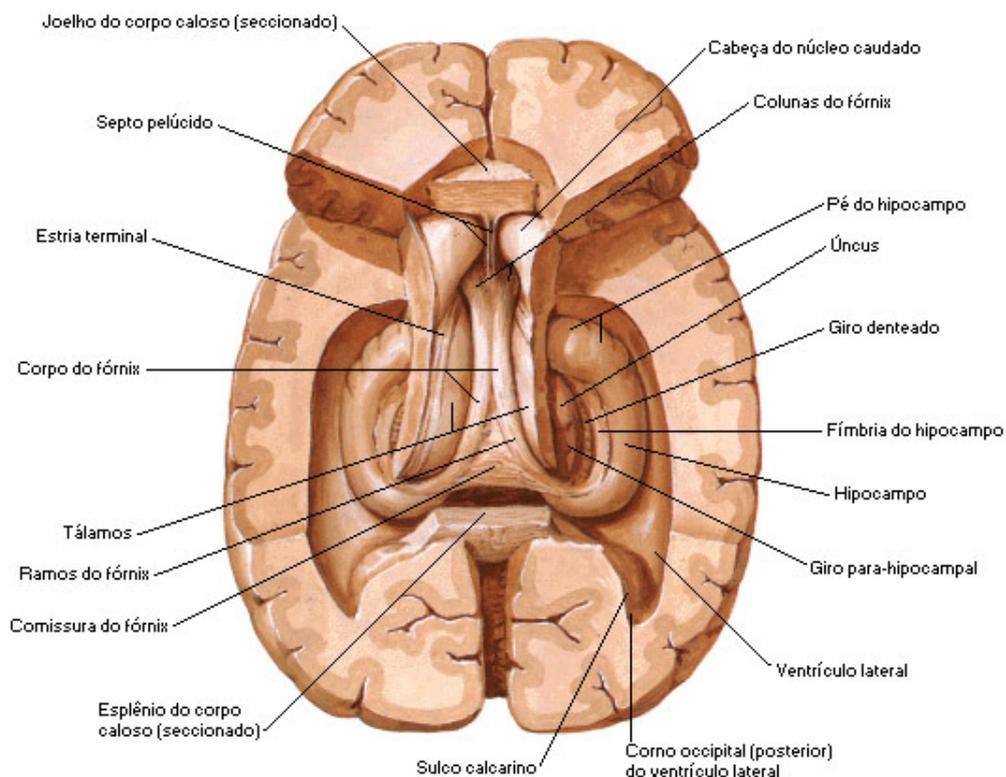
Ativações imunes perinatais ou complicações durante o parto podem causar danos ao hipocampo e córtex cerebral. Eventos que afetam o desenvolvimento cerebral durante a gestação e o período perinatal estão claramente relacionados com danos ao sistema nervoso central. Além disso, modificações do meio intra-uterino também podem aumentar o risco para ocorrência de outros transtornos psiquiátricos (AKIL e WEINBERGER, 2000).

Segundo Fatemi *et al.*, (1999); a inoculação viral pré-natal tem demonstrado elevada capacidade de causar anormalidades na morfologia do hipocampo, em concordância com os autores anteriores, FELEDER *et al* (2010); afirma que alterações imunológicas perinatais, podem afetar a estrutura e função do hipocampo.

Usando técnicas de neuroimagem foi mostrado que a exposição de fetos ao poly I: C levou ao surgimento de anormalidades estruturais no cérebro dos animais, apresentando os ventrículos laterais aumentados e menor hipocampo (PRASAD, 2008).

A utilização de modelos experimentais de ativação imune pré-natal e pós-natal em animais são ferramentas indispensáveis para confirmar a hipótese de associação entre exposição à infecção viral, o aumento do risco de alterações neurodesenvolvimentais e o teste de novos fármacos úteis para o tratamento destes transtornos.

Figura 01: Vista superior do hipocampo



Fonte: NETTER, FRANK H., Atlas de Anatomia Humana. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

No modelo neurodesenvolvimental pela administração da substância poly I:C, um poliribonucleotídeo sintético que provoca respostas imunes similares aos observados durante a infecção viral, a injeção em ratas grávidas levou a um amplo espectro das alterações, como a presença de déficits neuropatológicos e funcionais no animal adulto (MEYER *et al.*, 2004).

De acordo com Aguiar *et al.*, (2010), Esses experimentos dão consideráveis evidências de que a ativação imune por infecção pode afetar negativamente o desenvolvimento do sistema nervoso central.

O tratamento precoce com antipsicóticos atípicos pode reduzir o risco de transição para a psicose, mas são necessários estudos sobre a prevenção das anormalidades neuroanatômicas.

Nos estudos *in vivo* utilizando ressonância magnética foi mostrado que o tratamento com o antipsicótico atípico clozapina durante um período assintomático da adolescência impede o surgimento de anormalidades estruturais no cérebro de ratos adultos expostos a desafios imunológicos pré-natais (PIONTKEWITZ, ARAD E WEINER; 2011).

Em um trabalho realizado anteriormente por nosso grupo a administração de clozapina foi capaz de reduzir alterações neuroinflamatórias, minimizando os déficits de inibição pré-pulso e memória de trabalho em ratos. O tratamento com clozapina reduziu também a ativação microglial e a expressão da iNOS em diferentes áreas cerebrais com ênfase superior no hipocampo (RIBEIRO, *et al.*, 2013).

As funções do PUFA-N3 são: neurogênese, melhora da neurotransmissão e proteção contra o estresse oxidativo, preservando a integridade da condutividade nas fibras nervosas, atua protegendo diretamente culturas de células nervosas da excitotoxicidade. Em suma, o PUFA-N3 apresenta proteção contra perda neuronal no hipocampo. O impacto de proteção do PUFA-N3 reafirma a utilização clínica deste suplemento dietético como uma profilaxia contra a lesão cerebral (PU *et al* 2013),

O PUFAs- N3 são compostos que têm um papel estrutural importante no sistema nervoso e são essenciais para o desenvolvimento neurológico, diversos resultados apontam que os mecanismos envolvidos incluem diminuição da neuroinflamação e do estresse oxidativo, suporte neurotrófico e ativação de vias de sobrevivência celular (MICHAEL – TITUS E PRIESTLEY; 2014).

Tendo por base estas diversas evidências este estudo foi delineado com o intuito de ampliar a compreensão e buscar determinar os possíveis efeitos neuroprotetores dos PUFA-N3 e da clozapina em cultura primária de células hipocampais submetidas a um estímulo neuroinflamatório induzido pela exposição ao vírus mimético poly I:C.

O objetivo deste trabalho foi estudar os possíveis efeitos neuroprotetores do PUFA-N3 e clozapina na neuroinflamação induzida por Poly I:C em cultura primária de células neuronais hipocampais.

Metodologia: No presente estudo, foram utilizados ratos recém-nascidos (1º dia pós-natal). Os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como o Guia de Cuidados com animais de laboratório (OLFERT *et al.*, 1993). O Comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Ceará aprovou o estudo com seguinte número de protocolo 33/13.

No que se refere às drogas utilizadas, os PUFAs-N3 utilizados neste estudo consistiram numa emulsão contendo aproximadamente 289 mg de ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22: 6, n-3) e 430 mg de ácido eicosapentaenóico (EPA, 20: 5, n-3) por ml de emulsão. Poly I: C e os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA.

Os componentes dos meios de cultura foram adquiridos da Thermo Fisher Inc., Waltham, MA, EUA. Os neurônios do hipocampo foram incubados com PUFAs - N3 ou clozapina na presença ou ausência de poly I: C (100 µg / ml, 148,9 µM) durante 72 horas. Para avaliar a melhor concentração dos fármacos de teste, as células foram cultivadas com PUFAs – N3 em várias diluições no meio de cultura: 1: 200 (EPA 3,5 µM, DHA 2,15 µM), 1: 100 (EPA 7,1 µM, DHA 4,3 µM) e 1:50 (EPA 14,2 µM, DHA 8,6 µM) ou com clozapina (1,5 µM e 3 µM) na presença ou ausência de poly I: C e submetidos ao teste de viabilidade celular.

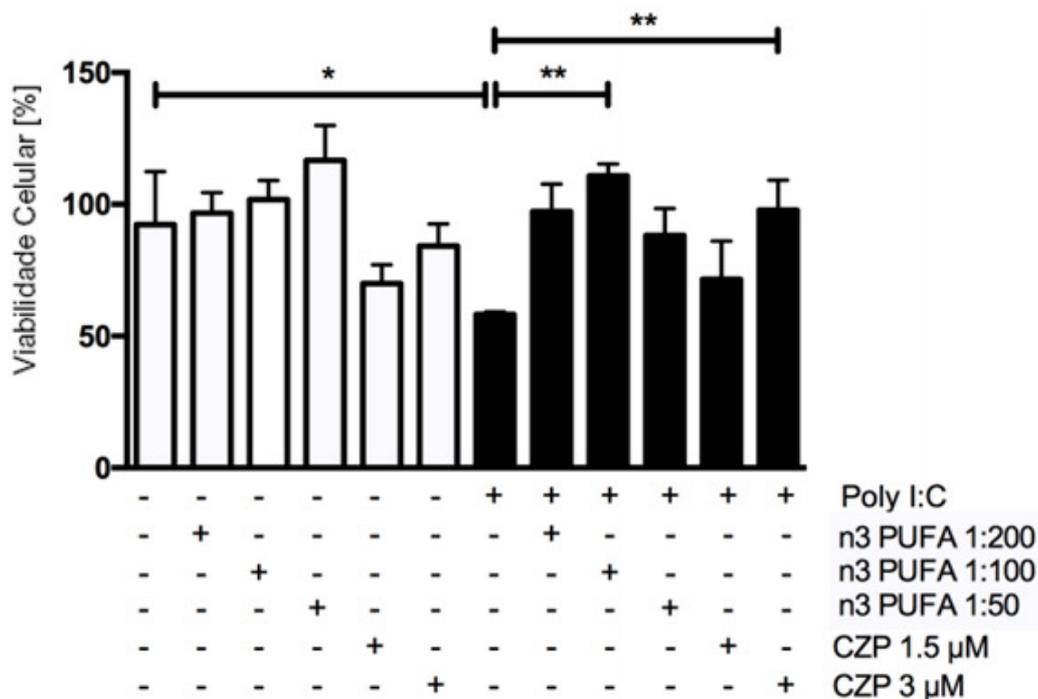
A viabilidade celular foi avaliada pela medição da redução de MTT, onde o meio foi removido e substituído por 300 µL do reagente MTT (1 mg / mL) durante 3 horas a 37 ° C. Os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em 100 µL de sulfóxido de dimetila. A absorbância foi medida a 570 nm, utilizando um leitor de placas UV. Os resultados foram expressos como percentagem de desidrogenase em relação aos controles não tratados (considerados 100% de viabilidade). Os seguintes parâmetros foram avaliados de acordo com as técnicas em parênteses: NFκBp50 e iNOS (imunofluorescência), NFκBp65 (imunoblot) e fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF (técnica de ELISA).

Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. Todos os resultados foram apresentados com média ± erro padrão da média (SEM). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises de dados foram realizadas pelo Software GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows (San Diego, Califórnia, EUA).

Resultados e Discussão: Os resultados encontrados evidenciaram que os PUFAs-N3 e a clozapina protegeram a viabilidade celular dos neurônios do hipocampo do dano induzido pelo desafio imune provocado pelo poly I: C. As células expostas a poly I: C apresentaram uma redução significativa da viabilidade em comparação com as células de controle ($P < 0,05$).

As doses de PUFAs- N3 1: 100 ou Clozapina 3 µM, impediram significativamente a redução da viabilidade celular induzida por Poly I: C ($P < 0,01$). Adicionalmente, a exposição celular a PUFAs- N3 em todas as diluições (1: 200, 1: 100 ou 1:50) ou clozapina (1,5 e 3 µM) apresentaram alterações significativas na viabilidade celular quando comparadas às células controle (Fig. 2)

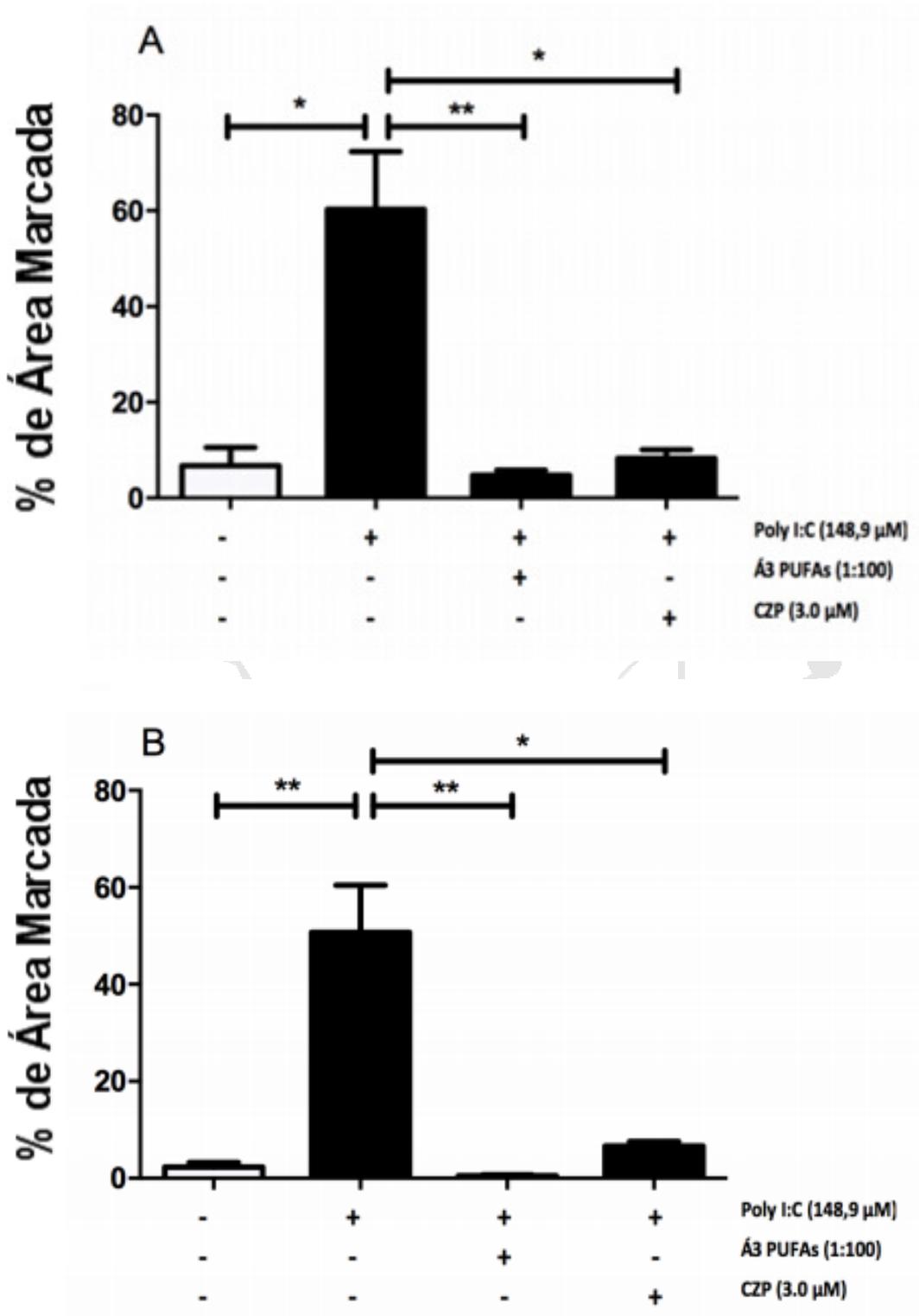
Figura 2: Efeito neuroprotetor do PUFAs – N3 e clozapina sobre a viabilidade celular dos neurônios do hipocampo expostos ao vírus poly I: C.



Efeitos de PUFAs-N3 1: 200 (EPA 3,5 µM, DHA 2,15 µM), 1: 100 (EPA 7,1 µM, DHA 4,3 µM), 1:50 (EPA 14,2 µM, DHA 8,6 µM) e CZP (1,5 µM e 3 µM) na viabilidade das células neuronais na presença ou ausência de poly I: C expostas durante 72 horas. As culturas de células foram incubadas com MTT (1 mg / mL) durante as últimas 3 h de o experimento. A figura inclui dados de quatro experiências independentes (n = 8-10 amostras), em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05, ** P <0,01. Abreviaturas: PUFAs-N3 – n3 PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentanaenóico; CZP: clozapina; poly I: C: poliinosínico: ácido policitidílico.

O Poly I: C aumentou NFkBp50 e iNOS nos neurônios hipocampais o PUFAs-N3 na diluição de 1: 100 e clozapina 3 µM demonstraram os melhores efeitos protetores no teste de viabilidade celular. Para determinar a ocorrência da neurodegeneração inflamatória desencadeada por poly I: C, foi determinado os níveis de NFkBp50 e iNOS por imunocoloração em culturas neuronais do hipocampo (Fig. 3). O Poly I: C induziu aumento significativo de NFkBp50 (P <0,05) (Fig. 3A) e iNOS (P <0,01) (Fig 3B) bem como na comarcação da subunidade NFkBp50-iNOS (P <0,01) (Fig 3C) quando comparado com as células do grupo controle. Por outro lado, PUFAs- N3 1: 100 (P <0,01) ou clozapina 3 µM (P < 0,05) impediram de forma significativa o aumento da subunidade NFkBp50 e da Imunorreatividade para iNOS em células comarcadas.

Figura 3: Expressão da subunidade NFkBp50 e iNOS em neurônios do hipocampo tratados por PUFA – N3 ou clozapina.



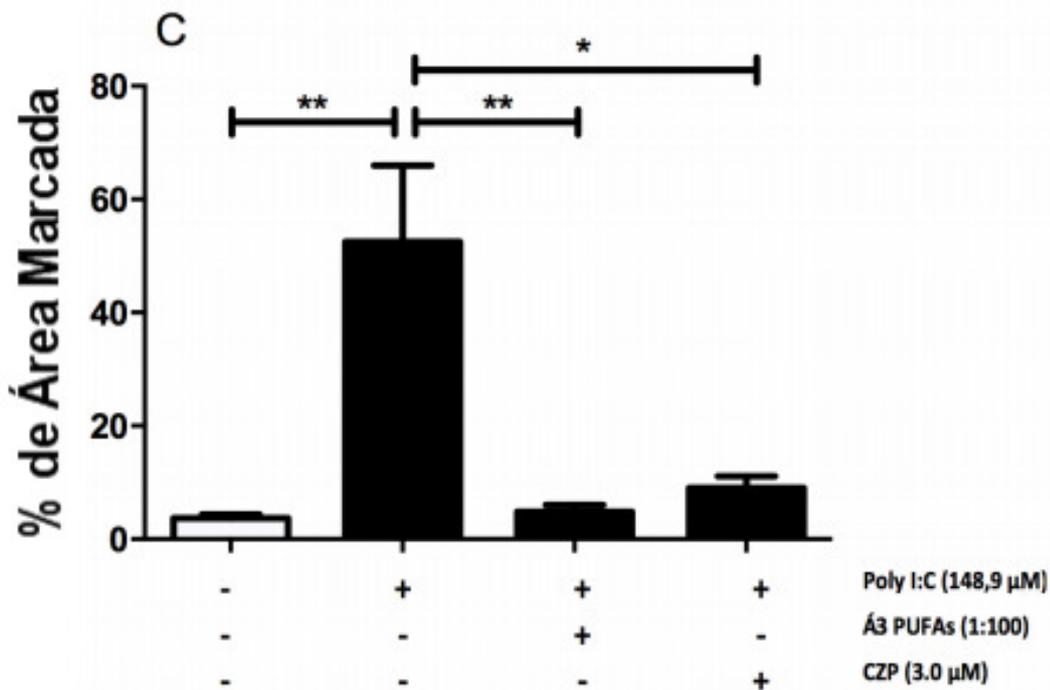
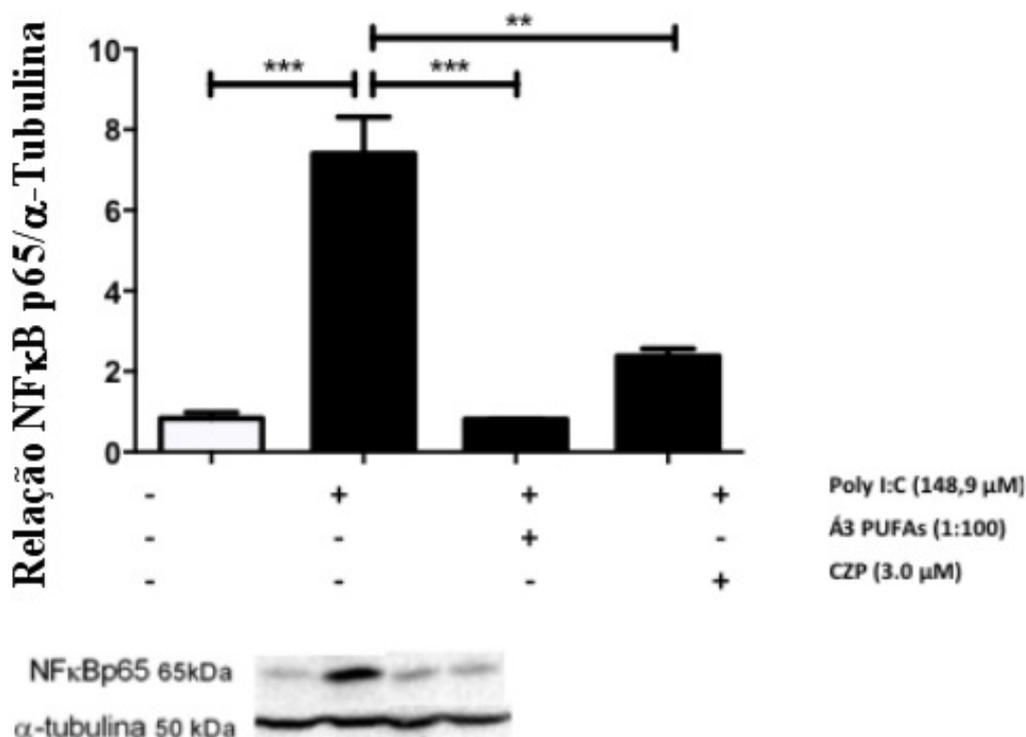


Figura 3: Efeitos de PUFAs-N3 1: 100 (EPA 7,1 μM, DHA 4,3 μM) ou CZP (3μM) na subunidade p50 NFκB (A), imunocoloração para iNOS (B) e coimunização NFκBp50-iNOS (C) em neurônios hipocâmpais primários desafiados com poly I: C. A quantificação foi realizada usando o software ImageJ. As barras representam a média ± Erro padrão da média (S.E.M.), n = 5 / grupo. Os dados foram analisados por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. * P < 0,05, ** P < 0,01. Abreviaturas: PUFAs-N3 – Á3 PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentanaenóico; CZP: clozapina; poly I: C: poliinosínico: ácido policitidílico; NFκB: fator nuclear kappa-B.

O poly I: C também foi capaz de aumentar a expressão de NFκBp65 em neurônios hipocâmpais. Objetivando compreender a participação de NFκBp65 nas alterações neuronais hipocâmpais, foi avaliada a imunexpressão de NFκBp65 por western blotting (Fig 4). Observamos que o desafio com poly I: C causou um aumento de 9,4 vezes na imunexpressão de NFκBp65 em comparação com as células de controle (P < 0,01). O tratamento com PUFAs- N3 1: 100 (P < 0,01) ou Clozapina 3 μM (P < 0,05) impediu o aumento da expressão de NFκBp65. (Fig.4)

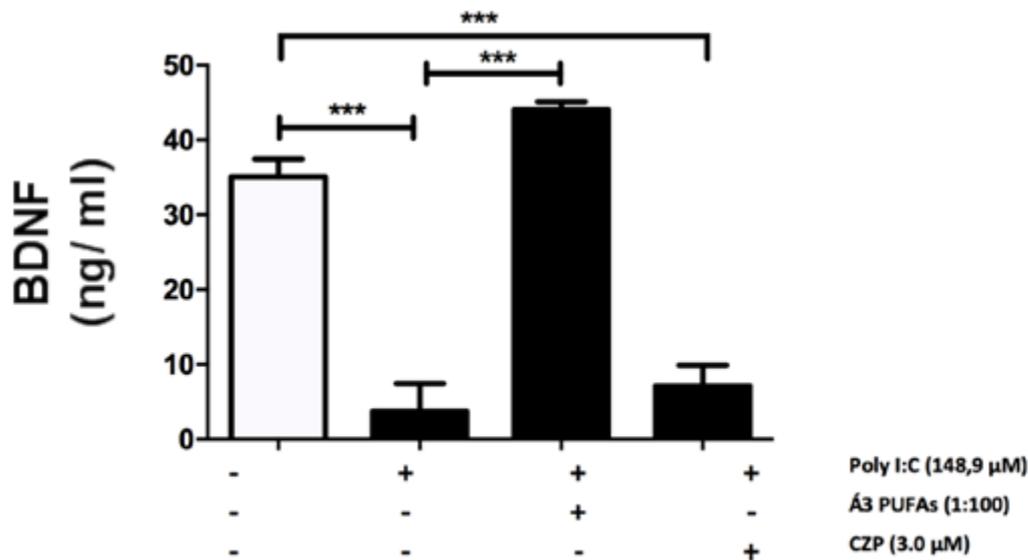
Figura 4: Expressão da subunidade NFκBp65 em neurônios do hipocampo desafiados por poly i:c e tratados por PUFAs- N3 ou clozapina.



Efeitos de PUFAs-N3 (EPA 7,1 μM, DHA 4,3 μM) e CZP (3 μM) na expressão protéica de NFκBp65 em neurônios hipocámpais primários desafiados com poly I: C. A quantificação foi realizada usando o software ImageJ. Barras representam média ± erro padrão da média (S.E.M.), n = 4 / grupo. Os dados foram avaliados utilizando ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05, ** P <0,01. Abreviaturas: PUFAs-N3 – n3 PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentanaenóico; CZP: clozapina; poly I: C: poliinosínico: ácido policitídílico; NFκB: fator nuclear kappa-B.

O PUFA-N3 protegeu as células hipocámpais primárias de lesões inflamatórias induzidas por poly I: C. Os resultados evidenciaram o envolvimento do NFκB na ação neuroinflamatória do poly I: C e sua inibição por PUFAs- N3 ou clozapina. Vale ressaltar a aparente superioridade do PUFAs- N3 comparada à ação protetora da clozapina, uma vez que somente PUFAs-N3 impediu a depleção dos níveis de BDNF induzida por poly I: C (Fig. 5).

Figura 5: Níveis de BDNF em neurônios do hipocampo tratados por PUFAs – N3 ou clozapina.



Os efeitos dos PUFA-N3 (EPA 7,1 μM, DHA 4,3 μM) e CZP (3 μM) em concentrações de BDNF em meio celular de neurônios hipocámpais primários desafiado com poly I: C. As barras representam a média ± erro padrão da média (S.E.M.), n = 6 / grupo. Os dados foram analisados usando ANOVA unidirecional seguido por Teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05, ** P <0,01. Abreviaturas: PUFAs-N3 – n3 PUFA: ácidos graxos poli-insaturados; DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentanaenóico; CZP: clozapina; poly I: C: poliinosínico: ácido policitidílico; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro.

Conclusão: Considerando o bom perfil de segurança do uso dos PUFAs-N3, até mesmo em períodos embrionários e neonatais e os efeitos da clozapina, os resultados encontrados na presente pesquisa agregam inúmeras evidências para a utilização destes fármacos como estratégia para o tratamento das consequências neuropatológicas de eventos neuroimunes precoces, tais como infecções virais, prevenindo e tratando assim o surgimento de possíveis alterações neuroinflamatórias

Referências Bibliográficas

AGUIAR, C.C. T., ALVES, C. D., RODRIGUES, F.A.R., BARROS, F. W. A., SOUSA, C. F. S., VASCONCELOS, S. M. M., MACEDO, D. S., *Schizophrenia: an inflammatory disease?* **J Bras Psiquiatr.** v.59(1):52-57, 2010.

AKIL, M., & WEINBERGER, D. **Neuropathology and the neurodevelopmental model.** In P. J Harrison & G. W. Roberts (Eds.), *The neuropathology of schizophrenia. Progress and interpretation* (pp. 189-212). New York: Oxford University Press, 2000.

FATEMI SH, EMAMIAN ES, KIST D, SIDWELL RW, NAKAJIMA K, AKHTER P. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of

prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry* 4:145–154, 1999.

FELEDER, C., TSENG, K.Y., CALHOON, G. G., O'DONNELL, P., Neonatal Intrahippocampal Immune Challenge Alters Dopamine Modulation of Prefrontal Cortical Interneurons in Adult Rats, *Biol Psychiatry* ;67:386–392 391, 2010.

MASI G, COSENZA A, MUCCI M, BROVEDANI P. A 3-year naturalistic study of 53 preschool children with pervasive developmental disorders treated with risperidone. *J Clin Psychiatry*.: 64: 1039–1047, 2003.

MEYER U, FELDON J, SCHEDLOWSKI M, YEE B.K. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.*;29:913–947. 2004

MICHAEL-TITUS, ADINA T., AND JOHN V. PRIESTLEY."Omega-3 fatty acids and traumatic neurological injury: from neuroprotection to neuroplasticity?"*Trends in neurosciences*, v 37, 30-38. 2014.

NETTER, Frank H.. Atlas de Anatomia Humana. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MCWILLIAM, A.A. *Guide to the care and use of experimental animals*. In: OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; McWilliam, A.A. (Eds.) *Canadian Council on Animal Care*. Ottawa, Ontario: Saskatoon, Saskatchewan, 1993. v.1, p. 213

PIONTKIEWITZ, Y., ARAD, M. & WEINER, I. Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1257–69, 2011.

PRASAD KM, KESHAVAN MS. Structural cerebral variations as useful endophenotypes in schizophrenia: do they help construct “extended endophenotypes”? *Schizophr Bull.*; 34 : 774–790. 2008.

PU, H., GUO, Y., ZHANG, W., HUANG, L., WANG, G., LIOU, A. K., & GAO, Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves neurologic recovery and attenuates white matter injury after experimental traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*,33(9), 1474-1484. 2013.

RIBEIRO, B. M. M. *et al.* Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine. *Schizophr. Res*, 12–9 (2013).