

MARIA LUIZA CORREIA DA SILVA

**Avaliação dos efeitos *in vivo* e *in vitro* da 21-*p*-
hexoxi-*m*-metoxibenzilideno digoxina (BD-15)
nas respostas induzidas por LPS.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

São Paulo

2023

MARIA LUIZA CORREIA DA SILVA

Avaliação dos efeitos in vivo e in vitro da 21-p-hexoxi-m-metoxibenzilideno digoxina (BD-15) nas respostas induzidas por LPS.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Correia da Silva, Maria Luiza

Avaliação dos efeitos in vivo e in vitro da 21-p-hexoxi-m-metoxibenzilideno digoxina (BD-15) nas respostas induzidas por LPS. / Maria Luiza Correia da Silva; orientador Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2023.

81 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Estresse Oxidativo. 2. Esteroides
Cardiotônicos. 3. BV-2. 4. Digoxina. 5. Hipocampo.
I. Scavone, Cristoforo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer aos meus pais. Aos dois pelo apoio, confiança, credibilidade e por me fazerem ser quem sou. A minha mãe, Sandra, por me dar colo em todos os momentos os quais eu necessitava e não parecia saber, as palavras de consolo quando tudo ficou bem difícil e os passes para curar a alma. Ao meu pai, Fabio, por todas as manhãs de sábado as quais preferiu atravessar a cidade para correr na cidade universitária e pode me ajudar a enfrentar mais um dia nessa jornada, além das risadas e dos incentivos.

Aos meus irmãos, Lucas e Eduardo, por serem dois fortíssimos pontos de apoio. Obrigada por me ouvirem reclamar mais que o normal, por me fazerem cafés e me oferecer comida quando eu esquecia de ser gente haha.

Ao meu namorado, Victor, que me deu forças pra enfrentar as adversidades com muita risada e boa companhia. A gente sendo bobo assim facilitou muita coisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo, por todo o suporte acadêmico, discussões e ideias que surgiram durante o período do meu mestrado. Assim como aos demais do corpo técnico do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Larissa, Diana, Ana Maria, Elisa pelo apoio e pela convivência. Cresci como cientista e pesquisadora neste período e muito disso se deve a vocês.

Ao professor Dr. Leandro Barbosa, que me mostrou que era possível sim, acreditou no meu potencial e gastou vários neurônios comigo no último mês.

A todos do Laboratório de Bioquímica Celular, os Labikers, em especial o a professora Dra. Herica de Lima, a Grazi Maia, o Israel, a Gilvânia, a Silvia, o Ítalo, a Jéssica, a Marina e o Cássio, que fizeram da UFSJ minha casa de novo, e me apoiaram na força tarefa final.

Aos meus amigos Uspicianos, Natacha, Paloma Segura, Giovanna, Martina, Odaias, Thiago, Amanda, Luiz, Isabela, Isis, Victória, Geovanna e Bianca, pelas cervejas, comidas, risadas, memes e discussões sobre resultados e experimentos que pareciam não fazer sentido. A pandemia tinha deixado tudo mais cinza, mas vocês coloriram tudo de volta.

Aos meus amigos de vida, Pablo, Lucas, Paulo, Paloma, Maria e Maisa, por estarem aqui sempre, mesmo que distantes presencialmente.

A toda a minha família, incluindo os agregados, que acompanhou desde o início toda a saga e torceu por mim.

Aos professores e funcionários do departamento, em especial à secretária do departamento Mônica Nunes que sempre foi muito solícita com todas as dúvidas que tive desde a inscrição para o processo seletivo da pós-graduação até hoje.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, essencial para realização dessa pesquisa. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 13538/2020-6.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

Correia, M.; Avaliação dos efeitos in vivo e in vitro da 21-p-hexoxi-metoxibenzilideno digoxina (BD-15) nas respostas induzidas por LPS., 2023. 82. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2023.

Quando o processo inflamatório acontece no sistema nervoso central (SNC) ele é chamado de Neuroinflamação. Esse processo é intimamente relacionado com a neurodegeneração, é um sintoma comum em diversas doenças que causam comprometimento tanto físico quanto cognitivo, como Parkinson e Alzheimer. A Na/K-ATPase (NKA) é uma enzima onipresente, cuja função é a manutenção do gradiente eletroquímico de Na⁺ e K⁺ em um organismo em homeostase. A partir da década de 90, a sinalização celular mediada pela NKA é descrita como um fenômeno capaz de guiar importantes processos na fisiologia celular como a inflamação. Os esteroides cardiotônicos, como a digoxina, possuem um mecanismo clássico no qual ao se ligarem a NKA causam inibição da atividade desta enzima, porém estudos atuais mostram a capacidade dessas substâncias desencadearem cascatas de sinalização anti-inflamatórias. A BD-15 é um fármaco sintético derivada da digoxina (utilizada no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva) que possui resultados preliminares promissores em relação a testes comportamentais e bioquímicos. A droga mostrou maior seletividade a isoforma $\alpha 3$ da NKA, presente principalmente em neurônios. O presente estudo visa verificar por meio de parâmetros de estresse oxidativo, modulação de lipídios e expressão de citocinas o potencial neuroprotetor da BD-15 e a indução da neuroinflamação em linhagem celular de células da glia (BV-2) e no hipocampo de ratos. Nas culturas de BV-2, os ensaios de MTT e LDH mostraram que tanto a BD-15 quanto o LPS não promoveram uma citotoxicidade significativa em relação ao controle não tratado. Ademais, o tratamento em conjunto não mostrou toxicidade aditiva dos dois compostos. Observou-se um aumento dos níveis de TNF- α nos grupos tratados com LPS e LPS + BD-15 em relação ao grupo controle tratado apenas com o veículo, porém esse efeito não foi visto nos níveis de citocina IL-1 β . Observou-se um perfil de redução do GSH e aumento de H₂O₂ nos grupos tratados com LPS, tanto em amostras de BV-2 quanto em hipocampo de animais tratados. Adicionalmente, o tratamento apenas com a BD-15 e LPS+BD-15 não mostrou alteração em relação ao controle nos mesmos ensaios. Nos ensaios de fosfolipídios

(Pi) totais verificou-se uma tendência a diminuição dos níveis de Pi apenas nos animais do grupo LPS. Na análise dos níveis de colesterol totais nas amostras de hipocampus nota-se um aumento, não significativo, dos níveis nos grupos tratado com a BD-15 e LPS+BD-15. Ao unirmos esses dados em uma relação colesterol/fosfolipídios, o grupo LPS possui a maior relação entre esses dois tipos de lipídios enquanto os grupos tratados com BD-15 e LPS+BD-15 mantêm o padrão encontrado no grupo controle, não tratado. Conclui-se então que embora os resultados *in vitro* não corresponderem ao padrão de reprodutibilidade e necessitem ser refeitos, os resultados apresentados *in vivo* mostram-se promissores em se tratar de elucidar mais sobre a atuação da BD-15 no estresse oxidativo e seu potencial neuroprotetor no modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

Palavras-chave: BD-15; Neuroinflamação; BV-2; LPS; Digoxina; Esteroides Cardiotônicos; Estresse Oxidativo; Hipocampo.

ABSTRACT

Correia, M.; Evaluation of the in vivo and in vitro effects of 21-p-hexoxy-m-methoxybenzylidene digoxin (BD-15) on LPS-induced responses. [Master's thesis in Pharmacology] - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; 2023.

When the inflammatory process occurs in the central nervous system (CNS), it is called neuroinflammation. This process is closely related to neurodegeneration and is a common symptom in various diseases that cause both physical and cognitive impairment, such as Parkinson's and Alzheimer's. The Na/K-ATPase (NKA) is an omnipresent enzyme whose function is to maintain the electrochemical gradient of Na⁺ and K⁺ in a homeostatic organism. Since the 1990s, NKA-mediated cellular signaling has been described as a phenomenon capable of guiding important processes in cellular physiology, such as inflammation. Cardiotonic steroids, like digoxin, have a classical mechanism in which they bind to NKA, causing inhibition of its enzyme activity. However, current studies show the ability of these substances to trigger anti-inflammatory signaling cascades. BD-15 is a synthetic drug derived from digoxin (used in the treatment of congestive heart failure) that has promising preliminary results in behavioral and biochemical tests. The drug has shown greater selectivity for the $\alpha 3$ isoform of NKA, which is mainly present in neurons. This study aims to evaluate, through parameters of oxidative stress, lipid modulation, and cytokine expression, the neuroprotective potential of BD-15 and its induction of neuroinflammation in a glial cell line (BV-2) and in the hippocampus of rats. In BV-2 cell cultures, MTT and LDH assays showed that both BD-15 and LPS did not promote significant cytotoxicity compared to the untreated control. Furthermore, the combined treatment did not show additive toxicity of the two compounds. An increase in TNF- α levels was observed in the groups treated with LPS and LPS + BD-15 compared to the control group treated only with the vehicle, but this effect was not seen in the levels of the cytokine IL-1 β . A profile of reduced GSH and increased H₂O₂ levels was observed in the groups treated with LPS, both in BV-2 samples and in the hippocampus of treated animals. Additionally, treatment with BD-15 alone and LPS+BD-15 did not show any changes compared to the control group in the same assays. Total phospholipids (Pi) assays showed a tendency towards decreased Pi levels only in the LPS group. In the analysis of total cholesterol levels in hippocampal samples, a non-significant increase in levels was

observed in the groups treated with BD-15 and LPS+BD-15. When combining these data into a cholesterol/phospholipid ratio, the LPS group had the highest ratio between these two types of lipids, while the groups treated with BD-15 and LPS+BD-15 maintained the pattern found in the untreated control group. It is concluded, therefore, that although the in vitro results do not correspond to the standard of reproducibility and need to be redone, the in vivo results presented are promising in terms of further elucidating the role of BD-15 in oxidative stress and its potential neuroprotective effects in the model of LPS-induced neuroinflammation.

Keywords: BD-15; Neuroinflammation; LPS; BV-2; Digoxin; Cardiotonic Steroids; Oxidative Stress; Hippocampus.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Neurodegeneração | 12 |
| 1.2 Na/K-ATPase (NKA) | 13 |
| 1.3 Esteroides Cardiotônicos (CTS) e vias de sinalização | 15 |
| 1.4 Neuroinflamação e o LPS | 20 |
| 1.5 Estresse Oxidativo | 27 |
| 1.6 Esteroides cardiotônicos e lipídeos de membranas neuronais | 31 |
| 1.7 21- <i>p</i> -hexoxi- <i>m</i> -metoxibenzilideno digoxina (BD-15) | 35 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 40 |
| 3. OBJETIVO | 41 |
| 3.1 Objetivos Específicos | 41 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 Linhagem celular | 42 |
| 4.2 Animais | 42 |
| 4.3 Tratamento dos animais | 43 |
| 4.4 Preparação de extrato e do homogenato de tecido hipocampal | 43 |
| 4.5 Preparação de extrato total de células | 44 |
| 4.6 Ensaio de viabilidade celular – MTT e LDH | 44 |
| 4.7 Determinação da concentração de proteínas totais | 45 |
| 4.8 Ensaio de ELISA | 46 |
| 4.9 Determinação do Teor de Glutathiona Reduzida (GSH) | 46 |
| 4.10 Determinação do conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) | 47 |
| 4.11 Extração Lipídica | 47 |
| 4.12 Determinação dos níveis de colesterol | 48 |
| 4.13 Determinação do conteúdo de fosfolipídios totais | 48 |
| 4.14 Ensaio de Western Blotting | 49 |
| 4.15 Análise estatística | 50 |
| 5. RESULTADOS | 50 |
| 5.1 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com LPS | 51 |
| 5.2 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com BD-15 . | 52 |
| 5.3 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com LPS (1µg/mL) e BD-15 | 53 |
| 5.4 Avaliação pelo método de ELISA de níveis das citocinas pró inflamatórias TNF-α e IL-1b in vitro | 55 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.5 | Determinação do Teor de Glutathiona Reduzida (GSH) e conteúdo Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) in vitro | 56 |
| 5.6 | Determinação do Teor de Glutathiona Reduzida (GSH) e conteúdo Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) in vivo..... | 57 |
| 5.7 | Análise do conteúdo de fosfolípidios totais e colesterol in vivo | 58 |
| 5.8 | Análise dos níveis de expressão da isoforma α 1 da Na,K-ATPase | 59 |
| 6. | DISCUSSÃO | 60 |
| 7. | CONCLUSÃO | 71 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neurodegeneração

A neurodegeneração é um sintoma comum em diversas doenças que causam comprometimento tanto físico quanto cognitivo. A perda progressiva de neurônios nas estruturas do SNC leva os indivíduos, acometidos por tais doenças, a perderem diversas funções motoras e psíquicas, o que eleva as taxas de morbidade (GITLER; DHILLON; SHORTER, 2017; GUEDES DA PAZ *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência de Parkinson, umas das doenças neurodegenerativas mais conhecidas, dobrou nos últimos 25 anos e as estimativas atuais sugerem que em 2019 cerca de 329 mil pessoas morreram em decorrência de DP, um crescimento de aproximadamente 100% em relação ao ano de 2000. Além disso, o Alzheimer e outras demências estão entre as 10 doenças que mais matam no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

No Brasil, cerca de 51 mil internações que aconteceram entre os anos de 2010 e 2020 tinham como causa doenças neurodegenerativas. Nesse mesmo período, foram registrados aproximadamente 3 mil óbitos com a mesma causa, sendo a região sudeste a com maior prevalência em ambos os casos. Os números são considerados baixos em relação a outras enfermidades, porém isso pode estar relacionado a subnotificação, casos sem tratamento ou mesmo não diagnosticados (GUEDES DA PAZ *et al.*, 2021).

Segundo o estudo *Global Burden of Disease* (em português, Carga Global de Morbidade), o número de adultos com 40 anos ou mais vivendo com demência em todo o mundo poderá quase triplicar até 2050 passando de cerca de 57 milhões em 2019 para 153 milhões. De acordo com os aumentos mais significativos dos casos devem ocorrer no leste da África Subsaariana. De acordo com o estudo, o número de pessoas com demência nessa região deve aumentar em 357. No Brasil, o número de casos aumentará cerca de 206% nas próximas década (figura 1) (NICHOLS *et al.*, 2022).

As doenças neurodegenerativas têm um impacto significativo na saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Estudar essas condições pode levar a avanços médicos que melhoram a qualidade de vida dos

pacientes, reduzem a carga sobre os sistemas de saúde, e ajudam a mitigar os custos socioeconômicos associados, além de permitir identificar alvos terapêuticos potenciais e desenvolver novas abordagens de tratamento, incluindo medicamentos, terapias genéticas e intervenções não farmacológicas.

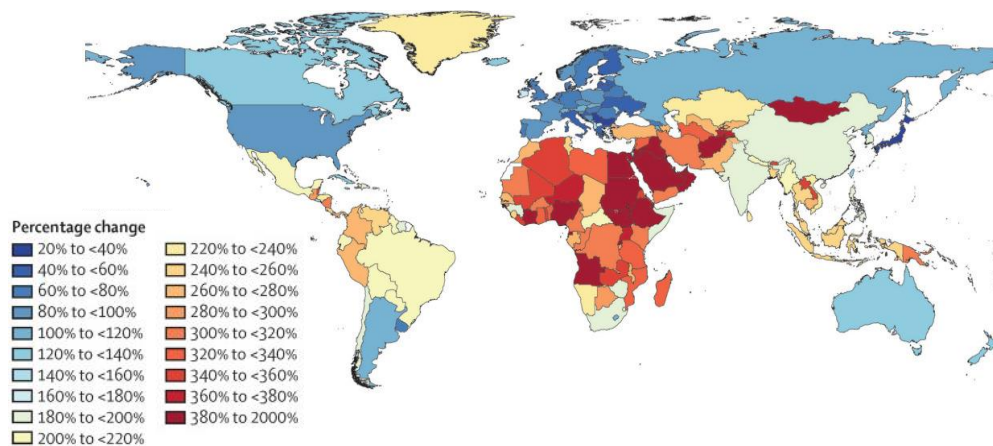


Figura 1 – Mapa com a porcentagem de mudança entre 2019 e 2050 no número total de pessoas com demência por país. Os países com o aumento mais expressivos são Djibouti (473%), Etiópia (443%) e o Sudão do Sul (396%) enquanto os menos expressivos encontram-se nos países da Ásia-Pacífico de alta renda.

1.2 Na/K-ATPase (NKA)

A NKA ou bomba de sódio é uma enzima onipresente na superfície de todas as células do organismo. Ela pertence a uma ampla classe de ATPases do tipo P responsáveis principalmente por catalisar pelo transporte ativo (intra e extracelular) de uma variedade de cátions através da membrana plasmática utilizando uma molécula de ATP por ciclo. Todas essas enzimas usam a hidrólise do ATP para conduzir o transporte de cátions contra um potencial eletroquímico (BLANCO; MERCER, 1998).

No caso da bomba de sódio, sua principal função é manter a diferença nas concentrações de sódio e potássio entre o ambiente intra e extracelular. Essas diferenças de concentrações são essenciais para processos de homeostase como comunicação entre células, além de contratilidade, manutenção dos equilíbrios osmótico, de potencial de membrana e de transdução de sinal. Nos rins, a NKA tem um papel fundamental na reabsorção de sódio e água, um fator essencial para a manutenção do volume extracelular e da pressão arterial. Assim, esta enzima é essencial, pois controla diversas funções vitais para a

célula. (BLANCO; MERCER, 1998; PACZULA; WIECEK; PIECHA, 2019; SIMAN, 2007).

A NKA é um heterodímero composto por três subunidades identificados como alfa, beta e família FXYD (figura 2). A subunidade alfa é uma proteína com 10 transmembrânicos e é a subunidade considerada catalítica. Possui sítios de interação com o Na⁺, K⁺, Mg⁺ e o ATP, substâncias estas envolvidas com o transporte, e para esteroides cardiotônicos, no lado extracelular, já a subunidade beta é um tipo de glicoproteína II com apenas um segmento transmembrana e essencial para a montagem da enzima e adesão celular. São conhecidas quatro isoformas de α e três isoformas de β , permitindo numerosas combinações do complexo $\alpha\beta$ formando isoenzimas com propriedade funcionais diferentes e que são expressas de maneira específica de acordo com características de tecidos e células (CEREIJIDO; CONTRERAS; SHOSHANI, 2004; GEERING, 2008; NEPAL; ARTHUR; SUNDARAM, 2019; PADILLA-BENAVIDES *et al.*, 2010).

A FXYD2, ou subunidade γ , é principalmente expressa no rim, porém é encontrada apenas nos túbulos distal e proximal ascendente e não em todos os segmentos do néfron. Estudos demonstraram como função mais proeminente dessa subunidade uma redução na afinidade por Na⁺. Ademais, em situações de grande despolarização de membrana há uma redução aparente na afinidade pelo K⁺, e em hiperpolarizações, há um aumento da afinidade pelo K⁺ (FLOYD *et al.*, 2010; FÜZESI *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015).

O complexo composto pelas isoformas $\alpha1\beta1$ é a combinação mais comum e está presente em quase todos os tecidos. A isoforma $\alpha2$ é expressa principalmente no coração adulto, músculo liso, músculo esquelético, cérebro, adipócitos, cartilagem e osso, já a isoforma $\alpha3$ é encontrada principalmente no tecido nervoso central e periférico além do sistema cardiovascular. A isoforma $\alpha4$ foi encontrada apenas nos testículos.

A isoforma, da subunidade beta, $\beta2$ é principalmente encontrada no cérebro e músculos, além de estarem presentes em tecidos cardíacos. Nas células granulares cerebelares, a subunidade $\beta2$, também conhecido como Molécula de adesão na Glia (do inglês *Adhesion Molecule on Glia* - AMOG), tem sido associado à adesão neurônio-astrócitos e migração de células granulares, sugerindo seu papel no desenvolvimento cerebelar. A isoforma $\beta3$ é encontrada

também no cérebro, nas cartilagens, em eritrócitos e nos pulmões (KAPLAN, 2002; LITAN *et al.*, 2020; PACZULA; WIECEK; PIECHA, 2019).

Ademais ao potencial enzimático desta proteína, há indícios de que a NKA tenha potencial sinalizador. Estudos mostram que a NKA é capaz de ativar vias de quinases e fatores de crescimento, produzir espécies reativas de oxigênio, entre outros (AIZMAN; APERIA, 2003; XIE, 2003).

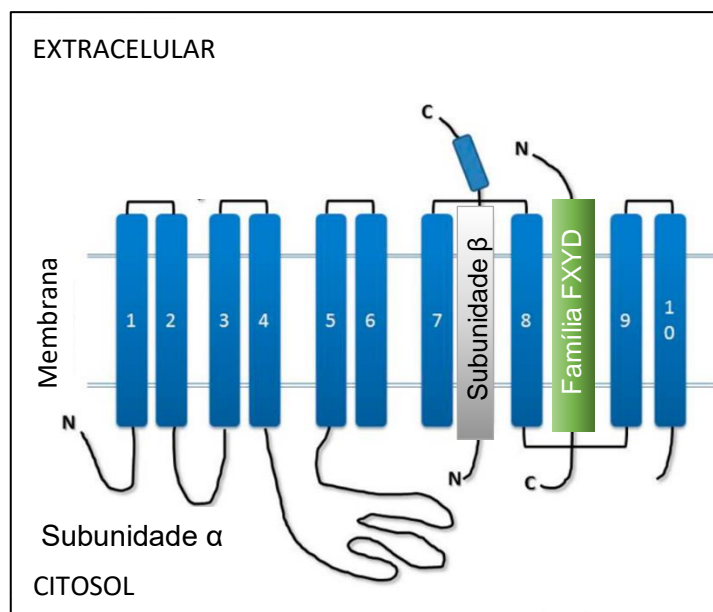


Figura 2 - Representação esquemática dos domínios das subunidades da NKA. A enzima é composta por uma subunidade α (azul), uma subunidade β (cinza) e, em alguns tecidos, uma única extensão transmembranares contendo um FXYD invariante (verde). Adaptado de (FELIPPE GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

1.3 Esteroides Cardiotônicos (CTS) e vias de sinalização

Os esteroides cardiotônicos (CTS) são substâncias naturais de grande importância farmacológica, as quais são conhecidos principalmente por suas sólidas eficácias no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), usado como inotrópico positivo, devido aos seus efeitos inibitórios específicos sobre a enzima NKA presente na superfície celular do coração, e por sua atividade cronotrópica negativa na fibrilação atrial (FA). A Digoxina, um CTS descrito e utilizado na clínica há mais de 200 anos, atua causando um aumentando o volume sistólico e a pressão sanguínea, reduzindo a frequência cardíaca e estendendo um pouco o período de uma contração. Esse efeito pode resultar em uma melhora da função miocárdica e hemodinâmica, juntamente com o aumento

da perfusão dos tecidos (MAN *et al.*, 2019; PATOCKA *et al.*, 2020; ZIFF; KOTECHA, 2016).

O efeito benéfico dos digitálicos na terapia da insuficiência cardíaca levou à identificação de vários cardenólídeos derivados de plantas. As espécies vegetais mais estudadas são a *Nerium oleander* e *Strophantus gratus* produtoras, respectivamente, da oleandrina e da ouabaína (OUA). As espécies *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata* da família Scrophulariaceae, contêm os esteroides digitoxina, gitoxina e digoxina, em abundância (ORLOV *et al.*, 2020; SCHNEIDER *et al.*, 2017).

A estrutura geral dos CTS apresenta um núcleo esteroidal conservado, com uma hidroxila na posição C14 β , um anel lactônico na posição C17 β e pode, ou não, conter uma porção glicosídica, com uma ou mais unidades de açúcares, na posição C3 β . Estes esteroides são divididos, principalmente, em dois grupos: os cardenólídeos, contendo um anel lactônico de cinco membros, e os bufadienólídeos, contendo um anel lactônico de seis membros (figura 3) (MELERO; MEDARDE; SAN FELICIANO, 2000; MIJATOVIC; KISS, 2013; ORLOV *et al.*, 2020).

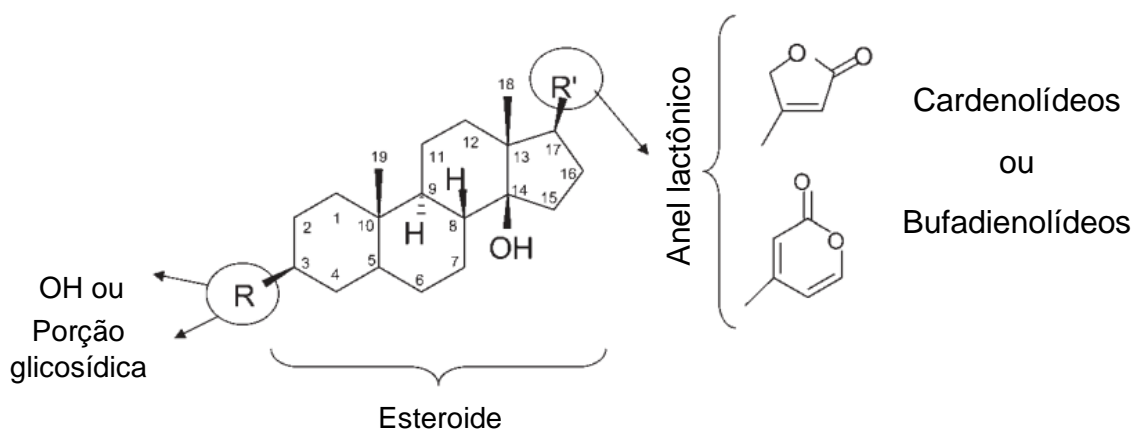


Figura 3 - Estrutura básica dos esteroides cardiotônicos. Adaptada de (MIJATOVIC; KISS, 2013).

Os esteroides cardiotônicos possuem a capacidade de se ligarem às alças extracelulares da enzima NKA, podendo levar a inibição da atividade da bomba de Na⁺. O mecanismo de ação mais aceito para os CTS envolve o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular responsável, no cardiomiócito, por ativar as fibras contráteis de actina e miosina II, perfazendo um mecanismo inotrópico positivo (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

Concentrações terapêuticas destes esteroides exercem então uma inibição parcial da bomba de sódio gerando um atraso no restabelecimento do balanço Na^+/K^+ antes da próxima despolarização da célula e consequentemente um aumento temporário na concentração de Na^+ intracelular. Um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, atua transportando estes íons para dentro ou para fora da célula, de acordo com seus gradientes de concentração (figura 4). Sendo assim, o aumento de Na^+ intracelular causado pela inibição parcial da NKA diminui a taxa de troca ou até mesmo inativa o transporte iônico do trocador, fazendo com que haja um influxo de Ca^{2+} , e, portanto, aumento na força de contração cardíaca (BLAUSTEIN, 1974; MELERO; MEDARDE; SAN FELICIANO, 2000; SCHNEIDER et al., 2017; YUSUF et al., 1992).

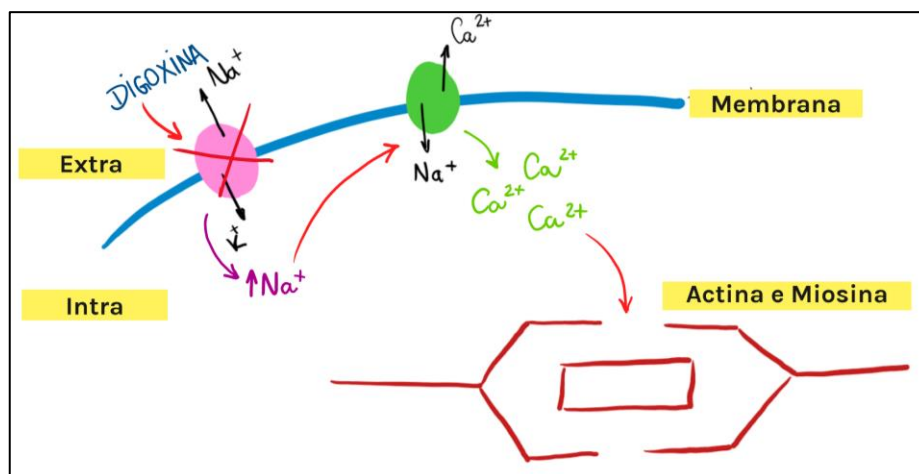


Figura 4 – Mecanismo de ação da Digoxina. A inibição parcial da bomba de sódio causada pela Digoxina gera um atraso no restabelecimento do balanço Na^+/K^+ antes da próxima despolarização da célula e aumenta temporariamente a concentração de Na^+ intracelular. Esse aumento de Na^+ intracelular diminui a taxa de troca ou até mesmo inativa o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, fazendo com que haja um influxo de Ca^{2+} e aumento na força de contração cardíaca. Imagem do autor.

É importante ressaltar que em doses acima da terapêutica ocorre uma inibição enzimática maior que 60% e como consequência as células não conseguem restabelecer o seu balanço iônico $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, no período da diástole, antes da próxima despolarização. Sendo assim, os altos níveis de Na^+ e Ca^{2+} intracelulares promovem efeitos tóxicos que geram sintomas de arritmias cardíacas e necrose celular (MELERO; MEDARDE; SAN FELICIANO, 2000).

Diversos estudos demonstraram que concentrações não tóxicas de ouabaína (faixa de pico a nanomolar) estimulam fosforilações em cadeia de múltiplas proteínas em diversos tipos celulares. Posteriormente, descobriu-se que a família de tirosino-quinases Src forma um complexo com a NKA, sendo

responsável por parte das fosforilações já que a bomba não possui atividade de quinase (ALLEN; EISNER; WRAY, 1985; AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001; HAAS; ASKARI; XIE, 2000; LI; XIE, 2009).

Estudos de Xie (2000) e Aizman (2003) propuseram a existência de “*pools*” de NKA na membrana plasmática que exerceriam duas funções: o “*pool clássico*” que permitiria a enzima a funcionalidade típica como uma bomba de íons, e o “*pool de transdução de sinal*”, no qual através de interações proteína-proteína esta ativaria um conjunto de moléculas sinalizadoras, tais como a ativação do fator nuclear κB (do inglês, *nuclear factor kappa B*, NF- κB) no SNC (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; ORELLANA et al., 2016).

Ademais, no hipocampo de ratos, a OUA, é capaz de ativar não só o fator de transcrição NF- κB , mas também a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (do inglês, *Cyclic AMP – responsive elemento-binding*, CREB). Nos neurônios piramidais hipocampais, esses fatores de transcrição desempenham um papel fundamental na regulação das cascatas de sinalização envolvidas na neuroproteção e na formação de memórias de longa duração. Além disso, o CREB é capaz de regular a liberação do fator neurotrófico derivado de cérebro (do Inglês, *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) (ORELLANA et al., 2018). O BDNF aumenta a neurogênese, melhora a aquisição de memória e tem efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios, além de proteger contra lesão cerebral induzida por hipóxia/isquemia (CHEN et al., 2013).

Um outro estudo em hipocampo de ratos, no qual os animais foram tratados com OUA e depois de 20 minutos receberam uma dose de LPS i.p., a OUA reverteu as diminuições induzidas por LPS nos níveis de BDNF, sugerindo uma ação deste composto contra a resposta de sinalização inflamatória no SNC. Ademais mostrou uma diminuição do RNAm de citocinas pró inflamatórias, da enzima óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *Inducible Nitric oxide synthase*, iNOS) e IL-1 β . O pré-tratamento com OUA também reverteu a ativação da proteína ácida fibrilar glial (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) induzida por LPS, a inflamação associada no giro denteado e bloqueou a translocação da subunidade p65 do NF- κB e a degradação de I κB , ambos mecanismos importantes para o processo inflamatório (KINOSHITA et al., 2014).

Nosso grupo mostrou anteriormente, em cultura primária de neurônios cerebelares preparadas a partir do 8º dia pós-natal de ratos wistar filhotes, que

a OUA pode ativar NF- κ B através da cascata de sinalização NMDAR-Ras-Raf-ERK. Essa cascata de sinalização leva ao aumento dos níveis de mRNA de BDNF, indicando um importante resposta adaptativa no sistema nervoso central (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013)

O papel imunomodulador da OUA foi avaliado no modelo de peritonite induzida por Zymosan em camundongos. Nesse estudo a OUA foi capaz de diminuir os níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), além de reduzir cerca de 30% a atividade da NF- κ B. Ademais, o tratamento com OUA causou uma redução no número total de células, como reflexo da redução do número de leucócitos na cavidade peritoneal em 4h, e um menor extravasamento de plasma, característico da primeira fase da inflamação (LEITE *et al.*, 2015).

A bufalina, utilizada no modelo clássico de edema de pata induzido por carragenina, reduziu potentemente o volume do edema e diminuiu os níveis de expressão de iNOS, ciclooxigenase-2 (COX-2), IL-1 β , interleucina-6 (IL-6) e TNF- α . Esse mesmo estudo mostrou um efeito antinociceptivo da Bufalina. De fato, esse composto reduziu significativamente (de maneira dose-dependente) o número de contorções induzidas por ácido acético administrados intraperitonealmente em camundongos e essa resposta tem relação pelo menos em parte com a diminuição dos níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β . (WEN *et al.*, 2014).

Assim como a bufalina, no modelo clássico de edema de pata, a OUA também foi capaz reduzir o edema. Além disso, foi capaz de inibir a inflamação após 30 minutos, 1, 2 e 6 horas, mas não em 24 horas após o desafio com carragenina. Constatou-se também uma redução significativa do edema causado por PGE2 e bradicinina. Esses achados sugerem que o efeito anti-inflamatório da OUA pode estar relacionado a inibição da prostaglandina E2, bradicinina, supressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e pelo bloqueio da via de sinalização TNF- α /NF- κ B (DE VASCONCELOS *et al.*, 2011).

A digoxina demonstrou efeito antitumoral em células não pequenas de câncer de pulmão, especificamente nas linhagens celulares A549 e H1299, e em células de linfoma de Burkitt (BL). No primeiro, esse fármaco demonstrou inibir a fosforilação de moléculas sinalizadoras do PI3K/Akt, incluindo Akt e mTOR, que

são conhecidas por estarem envolvidas na sobrevivência, proliferação, metástase e autofagia de células tumorais, enquanto que no segundo estudo a digoxina inibiu a atividade de duas proteínas, NF- κ B e TNF- α , além de suprimir a expressão de genes iniciadores de NF- κ B, como Bcl-2, Bcl-xL, cyclin D1 e c-myc (WANG, T. *et al.*, 2017; WANG, Y. *et al.*, 2021).

Ademais a esse efeito observado em células tumorais, um estudo que investigava o uso da digoxina na artrite induzida por colágeno (CIA) demonstrou a capacidade da droga de suprimir a incidência de artrite e inflamação articular em camundongos. Foram injetados intraperitonealmente, em camundongos com CIA, digoxina ou veículo três vezes por semana para investigar o efeito preventivo ou terapêutico. A expressão de IL-17 e outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-21, foram significativamente reduzidas nas articulações artríticas de camundongos tratados com digoxina (LEE *et al.*, 2015).

Estes mecanismos de ação dos esteroides cardiotônicos abriram novas perspectivas para uso terapêutico como: inflamação, neuroinflamação e doenças neurodegenerativas.

1.4 Neuroinflamação e o LPS

A inflamação é um processo biológico em resposta a uma lesão, trauma ou infecção que atinge os tecidos ou células, descrita a milhares de anos em documentos médicos antigos. O médico romano Cornelius Celsus no século I d.C. foi o primeiro a defini-la e descrever os sintomas clássicos que são conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: vermelhidão, inchaço, calor e dor. Posteriormente, em 1858, Rudolph Virchow acrescentou a perda da função do órgão afetado como o quinto sinal cardinal da inflamação (MEDZHITOV, 2008, 2010).

Estudos posteriores observando tecidos vivos mostraram a emigração de leucócitos dos vasos sanguíneos e outras mudanças vasculares características de uma resposta inflamatória aguda, além da observação de vasodilatação, vazamento de plasma e migração de leucócitos para fora dos vasos sanguíneos e para o tecido circundante (MEDZHITOV, 2008, 2010).

A inflamação é uma resposta complexa do sistema imunológico a danos teciduais ou à presença de patógenos. Ela é mediada por uma ampla gama de

moléculas sinalizadoras, incluindo citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), espécies reativas de oxigênio (EROs), quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL1) e lipídios bioativos, e é fundamental para a proteção do organismo contra infecções e lesões (CARSON; CAMERON THRASH; WALTER, 2006; MEDZHITOV, 2008, 2010). Quando efetivo, o mecanismo de resposta inflamatória elimina quaisquer invasores e inicia a cicatrização e angiogênese (CARSON; CAMERON THRASH; WALTER, 2006). Quando essa resposta inflamatória acontece no cérebro ou na medula espinhal, ela é denominada neuroinflamação (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016).

Tais mediadores são produzidos e gerados no SNC pelas células da glia, as micróglia e os astrócitos. Essas células possuem um papel importante na regulação na homeostase (CHEN, W. W.; ZHANG; HUANG, 2016), sendo conhecidas como as células da imunidade inata do SNC. Elas são fundamentais nas respostas de proteção dos neurônios, modulando mediadores da sinalização pró e anti-inflamatória (SCHAIN; KREISL, 2017; SHABAB *et al.*, 2017).

O grande foco da neuroinflamação está nas micróglia. Considerada como o macrófago residente do SNC, a micróglia é responsável por examinar o microambiente, sendo muito sensível a pequenas alterações, produzir e liberar citocinas, fagocitar patógenos e fazer reparação celular (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GRAEBER; LI; RODRIGUEZ, 2011).

A ativação dessas células vem sendo cada vez mais relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Várias dessas doenças cursam para a agregação de proteínas mutadas específicas, como por exemplo a doença de Alzheimer que está relacionada ao acúmulo de agregados de β -amiloide. A formação de agregados insolúveis pode gerar uma resposta inflamatória que inclui a ativação da micróglia (SCHAIN; KREISL, 2017).

Uma vez ativada, a micróglia passa a produzir os fatores pró-inflamatórios que podem causar danos em neurônios saudáveis, disfunção e perda das sinapses e até morte neuronal. O grau de neuroinflamação depende do contexto, duração e curso do estímulo primário ou insulto (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GRAEBER; LI; RODRIGUEZ, 2011; SCHAIN; KREISL, 2017; SHABAB *et al.*, 2017).

Diante desse contexto, existe uma hipótese que aponta desequilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória mediadas pelas células

neuroimunes, como uma possível causa de lesão do SNC (SCHAIN; KREISL, 2017). O processo inflamatório se inicia como forma de reparar um processo de lesão agudamente, porém quando a ativação da micróglia passa a ser crônica e a produção de componentes inflamatórios fica contínua e descontrolada o quadro é revertido para uma degeneração neuronal.

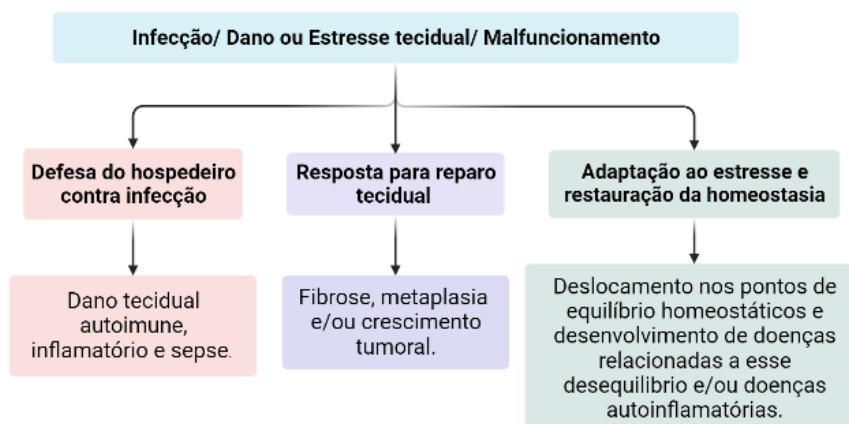


Figura 5 – Esquema mostrando as causas e as consequências patológicas e fisiológicas da inflamação de modo simplificado. Imagem do autor, criada com aplicativo BioRender.

A administração de lipopolissacarídeo (LPS) seja *in vivo* ou *in vitro* representa um modelo para os mecanismos reguladores da inflamação. O LPS é uma endotoxina presente na parede da membrana das bactérias gram-negativas que induz um quadro pró-inflamatório nos organismos (BEUTLER; DU; POLTORAK, 2001; KINOSHITA *et al.*, 2014; SAADE, 2021). Diversos estudos mostraram que a aplicação única ou múltipla de LPS no sistema periférico aumentou o número de células CD11 +, CD45 +, F4/80 + ou iba-1 +, além de serem notados alterações morfológicas nas micróglia que coincidem com características dessas células quando ativas (BIESMANS *et al.*, 2013; ERICKSON; BANKS, 2011; GODBOUT *et al.*, 2005; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016).

Além disso, é bem fundamentado que a injeção periférica de LPS induz diversos efeitos no SNC. A literatura mostra que uma injeção periférica de LPS altera significativamente os sistemas de transporte da barreira hemato encefálica (BHE) para insulina, leptina, peptídeo β amilóide, substratos de glicoproteína-P, TNF- α , entre outros. Apesar das citocinas liberadas no sistema periférico não atravessarem BHE, essas podem transferir o sinal para o cérebro e consequentemente mediar parcialmente a liberação de citocinas pró

inflamatórias pela micróglia (BIESMANS *et al.*, 2013; ERICKSON; BANKS, 2011; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016; PARK *et al.*, 2012).

Nos modelos *in vivo*, animais tratados com LPS desenvolvem o chamado *sickness behaviour*, ou comportamento doentio, um estado comportamental caracterizado por sintomas que incluem letargia, diminuição da atividade locomotora e do apetite, anedonia (incapacidade de sentir prazer de forma natural a atividades gratificantes), distúrbios do sono, além de aumento da sensibilidade à dor. Esses sintomas são comumente relacionados aos sintomas clinicamente relevantes de depressão em humanos e devido a isso, esse modelo é também usado com foco no estudo do comportamento depressivo (ERICKSON; BANKS, 2011; GODBOUT *et al.*, 2005; HENRY *et al.*, 2008; SPULBER *et al.*, 2012).

Essa resposta ao LPS se dá, principalmente, devido ao denominado eixo imune, um eixo bidirecional que liga o SNC ao sistema imunológico e permite uma comunicação por meio de várias vias, incluindo sinais químicos e neurais. As células do sistema imunológico possuem receptores para neurotransmissores e hormônios produzidos pelo sistema nervoso central, permitindo que elas sejam influenciadas pelo cérebro. Similarmente, o sistema nervoso central pode receber informações sobre o estado do sistema imunológico e modular a resposta imunológica de acordo com as necessidades do organismo. Ou seja, distúrbios do sistema imunológico, como inflamação crônica causada pela concentração de LPS no animal, podem afetar a função cerebral e estar associados a distúrbios neurológicos, como depressão, ansiedade e doenças neurodegenerativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; PAVLOV; CHAVAN; TRACEY, 2018).

No entanto, embora exista uma grande quantidade de literatura sobre os efeitos dessas citocinas, os dados relativos à sua presença após o desafio com LPS variam significativamente dependendo da dose de LPS, do sorotipo de LPS, da via de administração, dos ensaios utilizados, dos animais, do tempo de tratamento e da eutanásia, de acordo com os autores dos estudos (ERICKSON; BANKS, 2011; GODBOUT *et al.*, 2005; LOPES, 2016; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016).

Nava Catorce e Georkian (2016) e Lopes (2016) compilam várias informações sobre essas variáveis em estudos utilizando o modelo de neuroinflamação com

LPS. As concentrações utilizadas nos estudos analisados variam de 100 a 10.000 µg/kg, sendo administradas em uma única ou em múltiplas injeções, e o tempo para coleta do cérebro dos animais após a última injeção varia de 2 horas a 10 meses.

O tratamento com dose única de LPS i.p. na concentração de 330 µg/kg em camundongos BALB/c foi capaz de induzir aumento de RNA mensageiro (RNAm) de IL-1β, IL-6 e TNF-α em ensaio de RT-PCR e ELISA em amostras colhidas após 4, 8 ou 24 horas (GODBOUT *et al.*, 2005). Um outro estudo com duas doses de LPS i.p. (2000 µg/kg) em camundongos C57BL/6J mostrou o mesmo resultado com coleta de amostras em 4 e 24 horas (IP *et al.*, 2011).

Observa-se também nessas revisões que alguns dos protocolos utilizados são incapazes de mostrar diferenças entre os grupos controles e os grupos tratados. Em Tiwari e colaboradores (2016), o uso de 125 µg/kg de LPS i.p. em ratos machos em um tratamento contínuo em que a toxicidade foi induzida por 1, 2, 3, 4, 23, 24, 25 e 26 dias consecutivos não foi possível observar diferença em marcadores neuroinflamatórios (LOPES, 2016; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016; TIWARI *et al.*, 2016).

No presente trabalho usamos amostras de hipocampus de ratos que foram tratados com uma dose de 250 µg/kg durante 3 dias e as amostras foram coletadas após 24 horas a fim de vermos um efeito mais crônico do LPS. Ademais, usamos uma linhagem conhecida como alternativa para a cultura primária de micróglia em estudos principalmente farmacológicos, a BV-2 (LUND *et al.*, 2005, 2006).

A linhagem celular imortalizada de BV-2, originária de culturas microglicais murinas que foram infectadas com um retrovírus recombinante v-rflv-myc, exibiu as propriedades fenotípicas e funcionais de células microglicais reativas. Bocchini e colaboradores (1992) mostraram que essa linhagem expressa um canal de membrana de potássio que as permite diferenciar as culturas primárias de micróglia das culturas de macrófagos do corpo. Além disso, a BV-2 tem alto poder de fagocitose, uma propriedade característica da micróglia, e é capaz de lidar com infecções e neoplasias assim como macrófagos. São células que possuem uma linhagem estável e bem definida o que permite o seu uso em ensaios com reprodutibilidade confiável (BOCCHINI *et al.*, 1992).

A BV-2, estimulada por LPS, foi capaz de promover a translocação do NF- κ B e a secreção de IL-6. Além disso, em uma comparação entre os genes ativados em culturas primárias de micróglia e de BV-2, que receberam o mesmo tratamento com LPS, cerca de 90% dos genes ativados pelo LPS na BV-2 eram também encontrados em micróglia de cultura primária e 50% deles foram encontrados em camundongos tratados com LPS intracerebroventricular no ventrículo direito (HENN *et al.*, 2009).

O modelo de indução do processo inflamatório por meio de tratamento com LPS tem sua eficácia a partir da ativação do receptor *Toll-like 4* (TLR4). Essa ativação ocorre por uma cascata de eventos iniciando-se na ligação do LPS a uma proteína chamada LBP (proteína ligadora de LPS). O complexo formado facilita a extração dos monômeros de LPS pela proteína CD14, proteína essa encontrada na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Então, o novo complexo formado pelo LPS e CD14 é carregado, e o LPS é transferido à proteína mieloide de diferenciação 2 (MD-2) no complexo MD-2:TLR4. A MD-2 possui um sítio de ligação que acomoda uma parte do LPS enquanto uma outra porção interage com o TLR-4 e assim facilita a dimerização desde receptor, desencadeando sua ativação e conseqüentes reações em cascatas que ocorrem no meio intracelular (BEUTLER; DU; POLTORAK, 2001; PŁÓCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015; SAADE *et al.*, 2021; SHABAB *et al.*, 2017).

A dimerização do TLR-4 permite o recrutamento dos pares de proteínas TIRAP/MyD88 e TRAM/TRIF. A proteína MyD88 (fator mieloide de diferenciação 88) está relacionada a ativação de diversos segundos mensageiros de vias resultando na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e, conseqüentemente, na inflamação (PŁÓCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015; SAADE *et al.*, 2021; SHABAB *et al.*, 2017).

O NF- κ B é um dímero (homo ou heterodímero) formado por subunidades pertencentes a família Rel - p65 (RelA), p50, c-Rel, RelB e p52 - sendo as subunidades formadoras predominantes no cérebro de roedores a p65 e p50. Embora a maioria dessas subunidades sejam transcritivamente ativas, algumas das combinações possíveis entre elas são complexos inativos ou mesmo repressivos. Os complexos p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65 e p65/c-Rel são todos ativos transcritivamente, enquanto p50/p50 e p52/p52 são repressivos (GHOSH; MAY; KOPP, 1998).

Esse fator pode ser ativado por diferentes tipos de estímulos – como o LPS, citocinas, neurotransmissores, glicocorticoides, irradiação ultravioleta, espécies reativas de oxigênio, entre outros – e possui uma função bem estabelecida quanto a regulação de respostas inflamatórias. Ademais, o NF- κ B regula a diferenciação, a ativação e a função efetora de células T e estudos mais recentes têm mostrado o papel do NF- κ B na ativação de inflamassomas (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2010; LAWRENCE, 2009). O papel do NF- κ B no sistema nervoso ganhou interesse por causa de seu envolvimento em processos sinápticos, de neurotransmissão, de neuroproteção e principalmente na neuroplasticidade (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2010; LIU, T. *et al.*, 2017; ORELLANA *et al.*, 2016; SAADE *et al.*, 2021; SUTTERWALA; HAASKEN; CASSEL, 2014).

A ativação do NF- κ B é regulada pelo seu inibidor citoplasmático chamado inibidor kappa B alfa (I κ B α). O I κ B α é proteína responsável por mascarar o sinal de localização nuclear do NF- κ B, conseqüentemente esse fator não pode atuar como proteína transcritivamente ativa ou repressora. A ativação acontecerá com a separação desse complexo a partir da fosforilação da I κ B α pela proteína quinase I κ B (IKK). Após fosforilada a I κ B α sofrerá ubiquitinação pela enzima ubiquitina ligase e então será degradada por proteossomas, liberando o NF- κ B em seguimento acontece a translocação desse fator para o núcleo onde o NF- κ B, a depender do estímulo e das subunidades formadoras, liga-se ao promotor específico para ativar ou reprimir genes celulares alvo. (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013; GHOSH; MAY; KOPP, 1998; KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2010; KINOSHITA *et al.*, 2014; LIU, T. *et al.*, 2017; ORELLANA *et al.*, 2018).

Isto posto, estudos para elucidação da interação de compostos com essas vias são de extrema relevância a fim de expandir o conhecimento acerca do processo inflamatório desencadeado pelo LPS e analisar possíveis novos alvos terapêuticos.

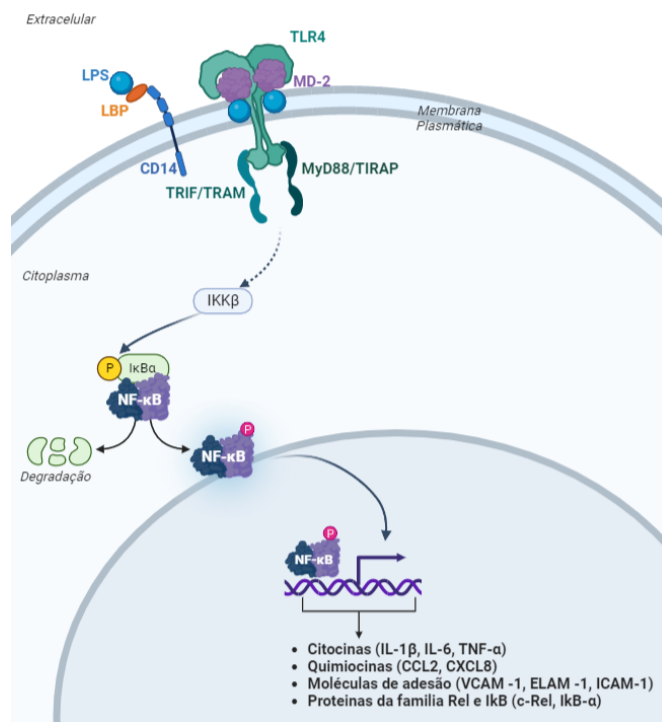


Figura 6 - Mecanismo de ação do LPS em TLR4. A ligação do LPS nesse receptor causa a ativação da MyD88 e TRIF, que ativam a IKK, proteína responsável pela degradação do IκBα. Após a degradação do IκBα o NF-κB, por sua vez, favorece a transcrição ou repressão de genes relacionados com o processo inflamatório e adaptativo. Imagem do autor, criada com aplicativo BioRender.

1.5 Estresse Oxidativo

O cérebro humano representa apenas 2% do peso corporal, porém consome aproximadamente 20% do oxigênio fornecido pelo sistema respiratório. Devido ao seu elevado consumo de energia e à presença de lipídios em quantidades significativas, o cérebro é especialmente suscetível ao estresse oxidativo (EO), sendo os neurônios particularmente vulneráveis a danos oxidativos, uma vez que possuem uma taxa metabólica mais elevada do que outras células (CHEN, Z.; ZHONG, 2014; FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; TELEANU *et al.*, 2022).

A oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos nos neurônios é uma característica patológica comum em doenças neurodegenerativas. Essas células contêm uma quantidade significativa de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) que podem interagir com espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando uma cascata de peroxidação lipídica e destruição molecular autossustentável. A fim de se protegerem desses efeitos, os neurônios empregam uma variedade de mecanismos defensivos que incluem “turnover” de lipídeos, degradação das

proteínas danificadas e excisão ou reparo de bases (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; RAD I *et al.*, 2014; TELEANU *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo é uma característica comum as doenças neurodegenerativas e é resultante da produção desregulada de EROs que tem como consequência um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes e antioxidantes nas células. Essas substâncias são catalogadas como uma classe de moléculas reativas derivadas do oxigênio e podem ser radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (HO^-), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$), e não radicais, por exemplo o H_2O_2 (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; JONES, 2008; TELEANU *et al.*, 2022).

Os membros dessa classe são conhecidos por terem vida curta e alta reatividade devido aos elétrons de valência restantes. Essas moléculas têm em comum a capacidade de facilmente oxidar demais moléculas com as quais estão em contato gerando reações em cadeia e, em última instância, levando a danos na estrutura celular (JONES, 2008; RAD I *et al.*, 2014).

As EROs estão associadas a diversos mecanismos celulares relevantes e quando há uma superprodução dessas moléculas, pode ocorrer a deterioração oxidativa de moléculas envolvidas no processo de envelhecimento e em diversas doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. A geração de EROs tem como um dos efeitos a ocorrência de danos nas membranas celulares, conhecido como peroxidação lipídica. Os ácidos graxos presentes nessas membranas podem passar por processos oxidativos, resultando na formação de radicais peroxil, alcóxil e hidroperóxidos lipídicos. Esses processos causam alterações na fluidez da membrana e, em casos mais graves, podem levar à sua ruptura (MERELLI; REPETTO; LAZAROWSKI, 2020; TELEANU *et al.*, 2022).

Diversos estudos foram realizados para determinar o papel das espécies reativas de oxigênio na evolução das doenças neurodegenerativas. Os resultados indicam que as EROs não representam um fator desencadeante dessas doenças, entretanto elas possivelmente podem agravar a progressão dessas doenças devido aos danos oxidativos e à interação com as mitocôndrias (MERELLI; REPETTO; LAZAROWSKI, 2020; TELEANU *et al.*, 2022).

Ademais, a inflamação é uma característica importante das doenças neurodegenerativas, que agrava a patologia ao ativar as células microgлияis,

liberar citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 e produzir espécies reativas de oxigênio. Em conjunto, esses eventos contribuem para a disseminação do estresse oxidativo, resultando na quebra e disfunção da barreira hematoencefálica e na alteração do microambiente cerebral (MEREELLI; REPETTO; LAZAROWSKI, 2020).

Para combater os danos oxidativos, as células possuem um sistema de defesa composto por dois sistemas: um sistema enzimático e um sistema não enzimático. O sistema enzimático é predominantemente constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Por sua vez, o sistema não enzimático é composto por substâncias como a vitamina C, glutathione reduzida (GSH), vitamina E, entre outras (FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; ISLAM, 2017; TELEANU *et al.*, 2022).

A GPx é uma enzima dependente de selênio e sua ação antioxidante está intimamente relacionado com as vias de estresse oxidativo. Ela faz parte da família das peroxidases e utiliza a glutathione reduzida (GSH) como cofator para catalisar a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos em água. Nessa reação catalisada pela GPx, o GSH serve como doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à oxigênio e água. Essa enzima é regulada pelo status redox da glutathione. A regeneração da GSH é essencial para manter a atividade da GPx, e isso é mediado por outras enzimas antioxidantes, como a glutathione reductase. Existem diversas isoformas da GPx, a GPx-1 é a forma mais comum e amplamente distribuída nos tecidos humanos, presente em várias organelas celulares, como mitocôndrias, citosol e peroxissomos. Apesar disso, é possível encontrar outras isoformas como a GPx-2 no trato gastrointestinal, a GPx-3 no plasma e nos tecidos extracelulares e a GPx-4 essencial na proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica (TELEANU *et al.*, 2022).

O GSH é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos cisteína, glicina e ácido glutâmico, cuja função principal é doar elétrons aos EROs a fim de neutralizá-los e, conseqüentemente, impedir que tais radicais interajam com moléculas próximas causando um desbalanço no equilíbrio oxidativos do ambiente celular. É um cofator essencial para várias enzimas envolvidas no metabolismo e na desintoxicação celular e está relacionado a regeneração de outros antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E. A deficiência de GSH ou um desequilíbrio na

relação oxidada/reduzida de GSH tem sido associada a uma variedade de doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento. O teor de GSH no SNC é de grande importância, apesar dos níveis de GSH no cérebro serem baixos quando comparados a outros tecidos e dependem do tipo celular. Estudos em pacientes com doenças neurodegenerativas e em modelos animais de processos neuroinflamatórios indicam uma redução nos níveis de GSH. (BALLATORI *et al.*, 2009; FILOMENI; DE ZIO; CECCONI, 2015; ISLAM, 2017; TELEANU *et al.*, 2022).

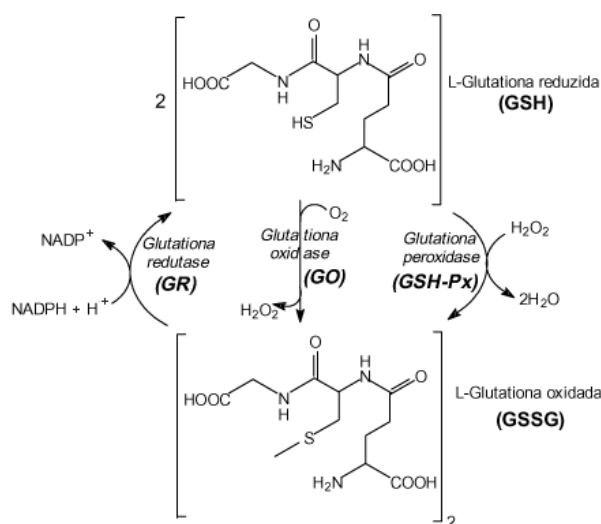


Figura 7 – Sistema antioxidante enzimático. A GPx atua como catalisadora, o GSH desempenha o papel de doador de elétrons, reduzindo o H_2O_2 a oxigênio e água. O GSH após ser oxidado (GSSG) é regenerado para manter a atividade da GPx e esse processo é mediado por outras enzimas antioxidantes, como a glutationa redutase (GR).

A catalase é outra enzima crucial ao processo antioxidante. Assim como a GPx, ela é responsável por decompor altas concentrações de H_2O_2 em água e oxigênio. É especialmente importante em tecidos que produzem ou são expostos a níveis elevados desse peróxido como é o caso do fígado. A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também pode ser encontrada em mitocôndrias e membrana plasmática. A CAT e a GPx trabalham em conjunto para garantir que o H_2O_2 e outros peróxidos sejam eliminados ou reduzidos a níveis seguros, minimizando assim o estresse oxidativo e os danos celulares associados (JONES, 2008; MERELLI; REPETTO; LAZAROWSKI, 2020; RADII *et al.*, 2014; TELEANU *et al.*, 2022).

Com base no exposto, torna-se evidente que a inflamação pode induzir um aumento excessivo de EROs e, conseqüentemente, exacerbar o estresse oxidativo, contribuindo assim para um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de processos neurodegenerativos.

1.6 Esteroides cardiotônicos e lipídeos de membranas neuronais

Os lipídios são componentes importantes do cérebro e podem representar até 50% do seu peso seco. Um estudo realizado em ratos adultos investigou a composição lipídica de todo o cérebro e encontrou quantidades aproximadas de 89 mmol/g de peso úmido para glicerofosfolipídios, 69 para colesterol e 31 para esfingolipídios. No cérebro de mamíferos adultos, os gangliosídeos são classificados em GM1, GD1a, GD1b e GT1b, representando cerca de 97% dos gangliosídeos presentes, mas com distribuição não homogênea no cérebro (FANTINI; YAHI, 2015a; KARTHIKEYAN *et al.*, 2011; SASTRY, 1985).

O conteúdo lipídico pode variar significativamente em diferentes áreas do cérebro, além de ser influenciado por fatores como idade, sexo e doenças neurais. Além disso, os padrões de expressão desses lipídios podem variar de acordo com o tipo celular específico (FANTINI; YAHI, 2015a; SASTRY, 1985; SCHNAAR; GERARDY-SCHAHN; HILDEBRANDT, 2014).

Os oligodendrócitos, células responsáveis pela síntese da mielina, expressam principalmente GalCer, sulfatida e GM3. Já os astrócitos, células que têm conexões metabólicas e de transporte de neurotransmissores com os neurônios, apresentam níveis elevados de gangliosídeo GM3. Os neurônios, por sua vez, possuem o conjunto mais completo de gangliosídios, incluindo as quatro principais espécies cerebrais mencionadas anteriormente (CASADIO, 2022; FANTINI; YAHI, 2015a; RADI *et al.*, 2014; SASTRY, 1985; SCHNAAR; GERARDY-SCHAHN; HILDEBRANDT, 2014).

Um estudo *in silico*, realizado utilizando o software HyperChem com o campo de força CHARMM, foi conduzido para facilitar a visualização das estruturas características de lipídios em forma de jangada de cada tipo de célula cerebral, com base na expressão específica de um subconjunto selecionado de glicosfingolipídios (figura 8) (FANTINI; YAHI, 2015a).

Esses estudos contribuem para o entendimento da composição lipídica do cérebro e como ela varia entre diferentes tipos celulares, fornecendo insights

sobre a importância dos lipídios na função cerebral e seu papel em condições neurológicas específicas.

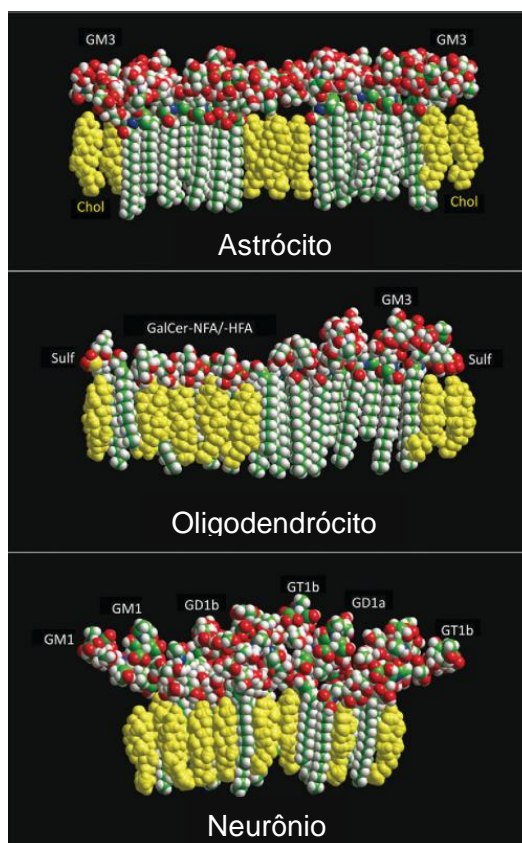


Figura 8 – Microdomínios lipídicos em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios. O modelo representa o conteúdo típico de glicosfingolipídios/colesterol da camada externa de uma porção lipídica presente na membrana plasmática de diferentes tipos celulares do SNC. Essas imagens foram obtidas por simulações de dinâmica molecular com o software HyperChem, usando o campo de força CHARMM. Nas imagens o colesterol é representado na cor amarela. Traduzido de (FANTINI; YAHI, 2015a)

O cérebro é o órgão mais rico em colesterol, contendo cerca de 20% do colesterol total do corpo. A maior parte desse colesterol está presente na mielina, representando cerca de 70% do total, enquanto aproximadamente 30% estão localizados nas membranas das células da glia e dos neurônios, onde desempenha um papel ativo no metabolismo celular e na reparação e remodelação neuronal (FANTINI; YAHI, 2015b).

No cérebro, o colesterol é principalmente sintetizado *in loco* a partir do acetato. Diferentemente de outros órgãos, o cérebro tem uma capacidade limitada de receber colesterol da circulação periférica. Durante o desenvolvimento inicial, os oligodendrócitos sintetizam grandes quantidades de

colesterol para a mielinização. Nos adultos, quando a mielinização está completa, a produção de colesterol é realizada principalmente pelos astrócitos, com contribuição menor dos neurônios (MAHLEY, 2016).

O colesterol sintetizado é secretado pelos astrócitos através de moléculas de transporte, como a proteína de ligação a ATP (ABCA1), e captado pelos neurônios através de receptores de lipoproteínas, sendo posteriormente internalizado no sistema de endossomo/lisossomo. Uma vez dentro das células neuronais, o colesterol é transportado para as mitocôndrias pela proteína Niemann-Pick C1 (NPC1), onde ocorre a síntese de neuroesteroides, como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e a allopregnanolona, a partir do intermediário pregnenolona, que é limitante na velocidade da síntese (SAYEED *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2004; WANG, J. M. *et al.*, 2005).

Esses neuroesteroides atuam em receptores nucleares e nos receptores de neurotransmissores NMDA/GABAA para promover a neurogênese e modular a neurotransmissão. Estudos demonstraram que a allopregnanolona foi mais eficaz do que a progesterona na redução do tamanho do infarto após um acidente vascular cerebral (AVC). Além disso, tanto a DHEA quanto a allopregnanolona estimularam a neurogênese (FANTINI; YAHI, 2015b; SAYEED *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2004; WANG, J. M. *et al.*, 2005).

A reciclagem e redistribuição do colesterol no cérebro envolvem uma via única de lipoproteína mediada pela apoE (apolipoproteína E) no sistema nervoso central (SNC). O cérebro possui um mecanismo especial em que o colesterol é renovado e os excessos são, eventualmente, transportados para o fígado e secretados na bile, em vez de deixar o cérebro diretamente. O próprio colesterol cerebral é convertido em um metabólito chamado 24S-hidroxicolesterol, que é muito mais solúvel do que o colesterol e acredita-se que atravesse a barreira hematoencefálica para entrar na corrente sanguínea. Nessa etapa, ele é captado por lipoproteínas plasmáticas, transportado para o fígado, metabolizado em ácidos biliares e excretado (FANTINI; YAHI, 2015b; SASTRY, 1985; YONEDA *et al.*, 2014).

Além disso, o colesterol também é o precursor para a biossíntese de neuroesteroides, que desempenham um papel importante no cérebro. Estudos em cérebros de indivíduos com doença de Alzheimer (DA) demonstraram uma diminuição geral. Os níveis de neuroesteroides, incluindo pregnenolona e

dehidroepiandrosterona, estão reduzidos na DA. Essa diminuição dos neuroesteroides está correlacionada com níveis aumentados de peptídeos β -amiloides e proteínas tau fosforiladas, características patológicas da doença. Ainda não se sabe se essas deficiências de neuroesteroides contribuem para a patologia da DA ou se são resultantes dela. No entanto, devido às propriedades neuroprotetoras dos neuroesteroides, é possível que seus níveis reduzidos contribuam para a neurotoxicidade do peptídeo β -amiloide (ADIBHATLA; HATCHER, 2008; CHANG *et al.*, 2017).

Em resumo, o cérebro é um órgão rico em colesterol, sintetizado localmente pelas células gliais e neurônios. Esse colesterol desempenha papéis essenciais na estrutura e função neuronal, além de ser precursor de neuroesteroides que promovem a neurogênese e a modulação da neurotransmissão. O entendimento desses processos é relevante para compreender as alterações metabólicas associadas a distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer.

Existem poucos relatos na literatura mostrando o efeito do tratamento com esteroides cardiotônicos sobre o conteúdo de lipídios e a modulação da fluidez da membrana celular.

Um estudo feito em diferentes linhagens celulares de origem humana, THP1 (macrófagos mononucleares humanos), HL-60 (células monocíticas humanas), U-937 (linfoma histiocítico) e Daudi (células B humanas), mostrou que o tratamento com oleandrina, um glicosídeo cardíaco polifenólico derivado das folhas de *Nerium oleander*, causou alteração da fluidez e da microviscosidade da membrana plasmática. Ademais, foi observado que a oleandrina impediu a ligação de IL-8, fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento nervoso (NGF) em seus respectivos receptores. Os autores sugerem que essa diminuição da afinidade pode estar relacionada a alteração da fluidez da membrana, que pode alterar a conformação dos receptores (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006).

Em nosso grupo de pesquisa, um estudo observou que em células HeLa, a digoxina foi capaz de causar uma diminuição no conteúdo total de colesterol e fosfolipídios. Além disso, a 21-BD, precursora da BD-15, aumentou os níveis totais de colesterol, mas diminuiu o conteúdo total de fosfolipídios. Ao avaliar os lipídios específicos da membrana celular, esse estudo mostrou que não foram afetados pela digoxina, mas a 21-BD aumentou os níveis de colesterol e

fosfolipídios. Os autores relatam que esse efeito da 21-BD, pode ser devido a uma translocação de fosfolipídios para a membrana plasmática combinada com uma possível degradação do armazenamento endomembranar ou dos sistemas de tráfego vesicular. Adicionalmente, a concentração de 21-BD utilizada nesse estudo (50 μ M) diminuiu consideravelmente a atividade da NKA nessas células (SILVA *et al.*, 2017).

Provavelmente, as alterações na composição lipídica da membrana influenciam na atividade da NKA por meio de mecanismos moleculares que envolvem modificações conformacionais da proteína. Isso ocorre devido ao estado físico dos lipídios, que, quando aumentados, resultam em restrições ao movimento molecular necessário para o ciclo de reação (YONEDA *et al.*, 2014).

Outros dois artigos publicados em nosso grupo, mostraram que o tratamento com ouabaína (1.8 μ g/kg, intraperitoneal) provoca uma modulação da composição de fosfolipídios totais, com aumento de 45% em relação ao controle no hipocampo, sem alteração na atividade da NKA, e uma diminuição de aproximadamente 50 pmol no cerebelo. (GARCIA *et al.*, 2017, 2018).

1.7 21-*p*-hexoxi-*m*-metoxibenzilideno digoxina (BD-15)

A digoxina é um esteroide cardiotônico e está entre os medicamentos mais antigos utilizados na cardiologia, usado no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva, fibrilação e até em alguns casos de arritmia (GHEORGHIADÉ; HARINSTEIN; FILIPPATOS, 2009; ROCHA *et al.*, 2014b).

Apesar da utilidade, a digoxina possui um índice terapêutico pequeno e um perfil farmacocinético complexo, além de uma janela terapêutica estreita, o que concede a esse fármaco uma toxicidade relativamente alta, além de diversos efeitos colaterais (MIJATOVIC; KISS, 2013; PATOCKA *et al.*, 2020).

Como exposto anteriormente, os CTS têm um papel importante na modulação da NKA, enzima essa que possui um papel de receptor e de transdutor de sinal intracelular. Esse papel tem sido intensamente explorado, com ênfase nas influências da expressão das diferentes isoformas alfa da Na, K-ATPase no sistema nervoso periférico e central, com o objetivo de usar a sinalização da NKA em tratamentos do câncer e de várias patologias do sistema nervoso periférico e central. Vários laboratórios projetaram e geraram novos derivados de CTS, principalmente pelo método de hemissíntese.

Nesse contexto, nossos colaboradores do Laboratório de Bioquímica celular da Universidade Federal de São João Del Rei realizaram estudos *in silico* de diversos derivados de digoxina que foram desenvolvidos com a intenção de diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia do composto, além de descobrir novas possibilidades de uso.

Inicialmente, o grupo de pesquisa desenvolveu um análogo sintético da digoxina denominado 21-benzilideno digoxina (21-BD), modificando o anel lactônico do composto original. Esse composto demonstrou efeitos citotóxicos e inibição do crescimento celular quando testado em células da linhagem HeLa, induzindo a apoptose nessas células. No entanto, a inibição da atividade da NKA foi observada apenas em concentrações elevadas do composto, na faixa de micromolares. Destaca-se que os CTS apresentam uma margem de segurança bastante estreita, podendo causar efeitos tóxicos secundários quando sua inibição sobre a NKA é sustentada. Além disso, a NKA está amplamente presente em todos os tecidos, com padrões específicos de expressão de suas várias isoformas, todas capazes de responder aos CTS, o que contribui para a ação generalizada desses compostos (PESSÔA *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2018).

Observando a necessidade de desenvolver compostos que possam direcionar mais especificamente uma das isoformas da NKA, o grupo sintetizou uma série de novos compostos derivados da digoxina, introduzindo substituintes não-oxigênio e éter no anel lactônico (figura 9) (PESSÔA *et al.*, 2018).

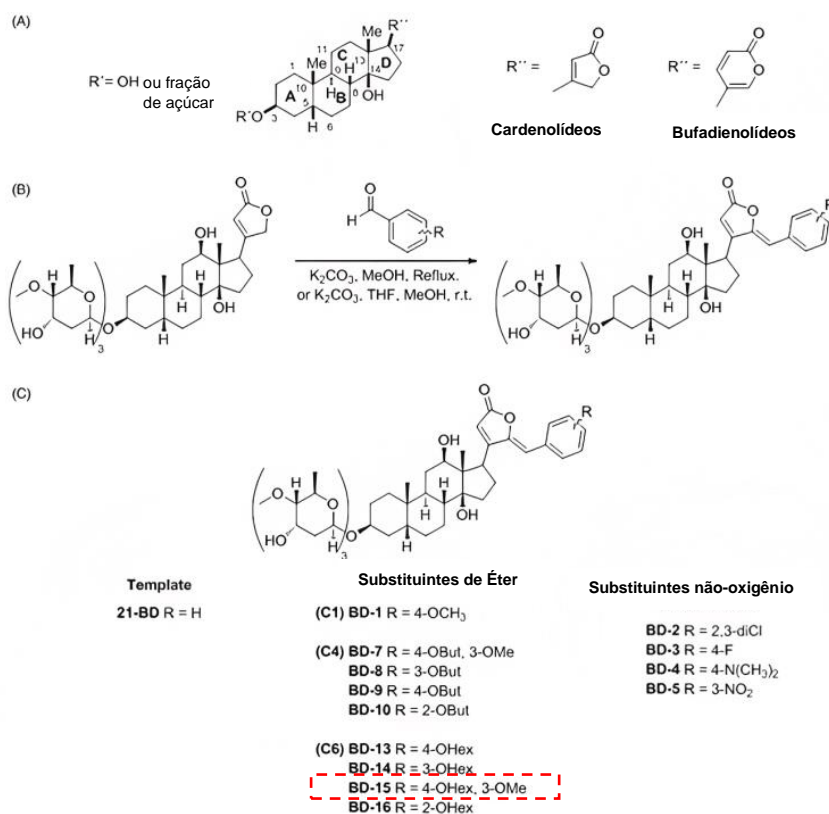


Figura 9 - Esquema geral da estrutura do esteroide cardiotônico (A), procedimento geral para a síntese de derivados de digoxina (B) e divisão de grupo e subgrupo de derivados de acordo com sua estrutura (C). Em destaque o composto BD-15, análogo utilizado nesse trabalho. Imagem adaptada de (PESSÔA *et al.*, 2018)

Esses compostos foram avaliados sobre a atividade da NKA e suas interações com as isoformas α da NKA usando uma abordagem de docking molecular que mostrou que alguns desses compostos exibem propriedades específicas de isoforma. Dentre as moléculas analisadas, destaca-se a denominada BD-15 (figura 10), 21-*p*-hexoxi-*m*-metoxibenzilideno digoxina, usada neste estudo (PESSÔA *et al.*, 2018).

A BD-15 mostrou nos estudos de docking que seu anel lactônico e o aminoácido Phe780 estão ligados por interações π , que são importantes para a estabilidade da ligação entre os compostos e a enzima.

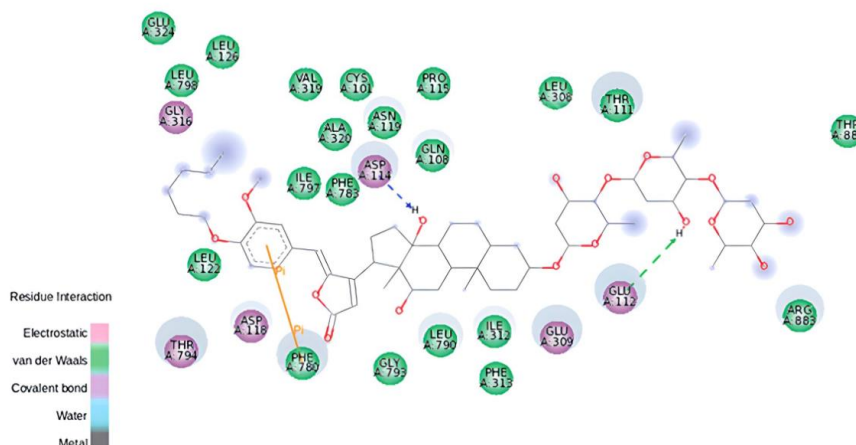
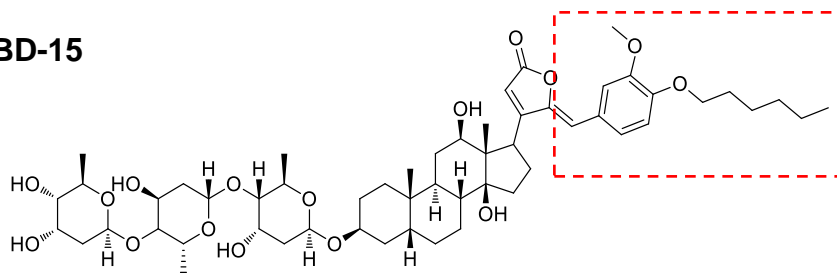


Figura 10 - Acoplamento molecular da BD-15 na isoforma a3 da NKA de rato. Os círculos verdes e magenta representam os resíduos envolvidos em interações de van der Waals e interações polares, respectivamente. O halo azul ao redor do resíduo é proporcional à superfície acessível ao solvente. As interações Pi são representadas por uma linha laranja e símbolos que indicam a interação específica. As setas tracejadas verdes estão direcionadas para o doador de elétrons e representam ligações de hidrogênio com as cadeias principais de aminoácidos. As setas tracejadas azuis estão direcionadas para o doador de elétrons e representam ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de aminoácidos (PESSÔA, *et al.*, 2018).

Ademais, esse estudo mostra que resíduos na estrutura da enzima, que estão envolvidos em interações com o núcleo esteroide dos CTS, são deslocados em direção à lactona e ao anel aromático do composto e a maioria das interações polares entre a BD-15 e a porção de açúcar das moléculas é abolida. Esses resultados indicam uma alteração na conformação da enzima ao se ligar ao composto e sugerem que as interações do grupo sacarídeo da BD-15 com a enzima NKA não são essenciais para a interação entre eles. Tais modificações podem significar uma menor afinidade pela isoforma α da NKA (PESSÔA *et al.*, 2018).

BD-15



Digoxina

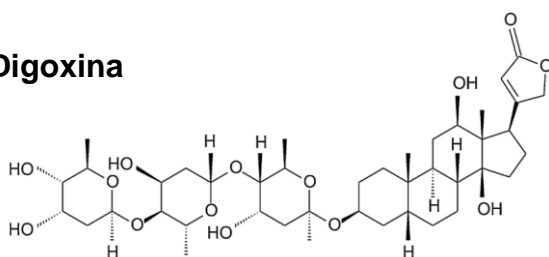


Figura 11 - Estrutura molecular do derivado de digoxina, BD-15, e da Digoxina. A BD-15 é um derivado de digoxina criado a partir de uma alteração no anel lactônico do composto original e a posterior introdução do éter. Imagem do autor.

Ainda nesse estudo, foram usadas preparações de membrana de células de inseto (Sf9), um isolado clonal de células *Spodoptera frugiperda* Sf21 (IPLB-Sf21-AE), para investigar a atividade, interação e seletividade dos derivados de digoxina sintetizados com as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da NKA. Nesses ensaios a BD-15 revelou possuir maior afinidade de ligação pelas isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 3$. Contudo, em relação a atividade, a BD-15 é capaz de estimular apenas a isoforma $\alpha 3$, que está presente principalmente em neurônios (PESSÔA *et al.*, 2018).

Em De Souza Gonçalves (2018) a BD-15 revelou ter efeitos neuroprotetores. Feito em células de neuroblastoma murino neuro-2a (N2a), esse estudo submeteu as células a isquemia química com azida de Sódio (5 mM) por 5 horas e depois foram tratadas com a BD-15 por 5 horas em concentrações variando de 50 nM a 1 μ M. Após 24 horas de reperfusão foram então feitos ensaios de MTT para avaliar o efeito neuroprotetor da droga. Todas as concentrações de BD-15 foram capazes de aumentar a sobrevivência celular, porém a concentração de 150 nM foi com maior efeito neuroprotetor, mais de 78% de sobrevivência em relação ao controle com apenas o tratamento indutor de isquemia química.

Os fatores que levam a morte neuronal acontecem principalmente após 24h da lesão isquêmica (HERTZ, 2008). Sendo assim, esse estudo também realizou um ensaio para avaliar a atividade da NKA após esse período de recuperação com a intenção de investigar se o efeito protetor tinha relação com essa enzima. A concentração de 150 nM de BD-15 causou a um aumento da atividade da NKA em relação ao grupo tratado apenas com azida de Sódio (5 mM). Demonstrando a BD-15 pode neutralizar uma redução na atividade da NKA causada por danos no processo isquêmico (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019).

Através da determinação de Malonaldeído (MDA), em homogenatos de células N2a, observou-se uma diminuição da peroxidação lipídica das células que foram tratadas com a BD-15 em relação as células que foram tratadas apenas com azida de Sódio. Os autores sugerem que esse composto possa ser usado como agente protetor evitando o dano ao gradiente iônico e aumentando a recepção de glutamato em uma infinidade de doenças nas quais o estresse oxidativo leva a dano celular (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos têm mostrado que a modulação da NKA parece importante para a melhora da cognição via subunidade alfa 3 e no desenvolvimento da neuroinflamação pelas subunidades alfa 2 e alfa 1. Moléculas capazes de modular a atividade NKA são uma alternativa promissora para tratamento de doenças neurodegenerativas cuja neuroinflamação seja um componente relevante. Atualmente, os compostos agonistas que ativam as isoformas da Na,K-ATPase tradicionais, podem atuar também como inibidores da atividade de transporte de íons a depender da dose administrada, além de possuírem uma vasta gama de efeitos colaterais indesejados. Por consequência disso, iniciou-se o desenvolvimento de compostos em busca de maior seletividade e consequentemente menos efeitos adversos.

Assim, esse estudo, além de explorar a ação anti-inflamatória do BD-15, recentemente sintetizado, pode contribuir para ampliar o conhecimento acerca do papel da NKA na modulação dos eventos inflamatórios decorrentes da exposição ao LPS e suas repercussões para o SNC.

3. OBJETIVO

Avaliar por meio de parâmetros de estresse oxidativo, expressão de citocinas o potencial neuroprotetor da BD-15 e a indução da neuroinflamação em linhagem celular de células da glia (BV-2) e no hipocampo de ratos.

3.1 Objetivos Específicos

- Padronizar o modelo de inflamação induzida por LPS e tratamento com BD-15 em células de linhagem de micróglia (BV-2) através das alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).
- Avaliar o teor de Glutathiona Reduzida (GSH) em células BV-2 e em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15;
- Avaliar o conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em células BV-2 e em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15;
- Determinação dos níveis de colesterol em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15;
- Determinação do conteúdo de fosfolipídios totais em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15;
- Avaliar a expressão das isoformas alfa 1 da NKA em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

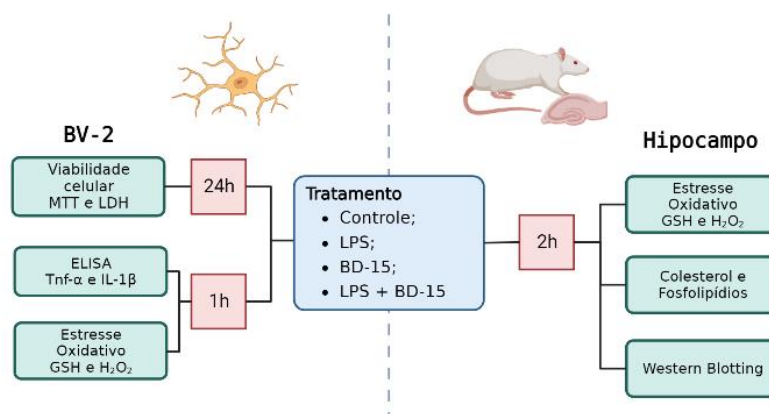


Figura 12 – Fluxograma simplificado de metodologias utilizadas no projeto. Imagem do autor, criada com aplicativo BioRender.

4.1 Linhagem celular

As células BV-2 (linhagem celular de micróglia derivada de ratos) foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Isaias Glezer (UNIFESP) e Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski (IQ-USP). As células BV-2 foram mantidas no meio DMEM suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 1% v/v de antibiótico penicilina-estreptomicina, tamponado com bicarbonato de sódio e pH ajustado para 7,4 (meio completo). As culturas foram mantidas em incubadora à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Uma vez atingido cerca de 80%-85% de confluência, avaliada com auxílio de um microscópio óptico de objetivas invertidas, o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com HBSS. Então, foi acrescentado 3 mL de tripsina 0.5% durante 10 minutos para a retirada da garrafa. Foi acrescentado meio com soro à garrafa e a solução foi transferida a um tubo de 15 mL. O tubo foi centrifugado a 123g por 10 minutos a temperatura ambiente. O pellet de células foi ressuscitado em meio de cultivo, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer e plaqueadas.

Para experimentos as células foram plaqueadas (2×10^6 células/poço em placas de 6 poços e em placas de petri (100mm) para Western Blotting e ensaios de estresse oxidativo, 2×10^6 células/poço em placas de 96 poços para MTT/LDH) ou mantidas em garrafas de 75 cm² até um próximo repique.

Já para a estocagem da linhagem celular, o mesmo procedimento para desprender as células aderidas às garrafas de cultura foi realizado e então essas foram centrifugadas, ressuscitadas e contadas em câmara de Neubauer. O volume equivalente a 10^6 células foi transferido para um criotubo contendo 1mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de DMSO. Após congelamento, em condições de resfriamento lento, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido por tempo indeterminado.

4.2 Animais

As amostras de hipocampo usadas neste estudo foram gentilmente doadas pelo professor Dr. Leandro Augusto Barbosa, da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ). Essas amostras foram obtidas de ratos Wistar machos adultos pesando entre 180 e 240g, obtidos do Biotério Central da UFSJ e mantidos no Biotério Setorial do Campus Centro Oeste com água e alimentação *ad libidum*. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (43 x 43 x 20

cm) em uma temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ (CEUA, protocolo 009-2017) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do ICB-USP (CEP-ICB, protocolo 1218-2022). Os ratos foram habituados ao biotério de experimentação por uma média de 7 dias antes do início dos experimentos.

4.3 Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em grupos com $n=06$, conforme descrito na tabela 1. O tratamento foi realizado por 2 horas. Inicialmente foi administrado via intraperitoneal (i.p), LPS ou solução salina. Após 20 minutos foram administrados BD-15 ou salina. As injeções foram realizadas pela manhã e após 2 horas os animais sofreram eutanásia e as amostras foram colhidas e armazenadas para uso em ensaios posteriores.

| Grupo de estudo | Tratamentos (i.p) |
|-----------------|--|
| (1) Controle | Solução salina + Solução salina |
| (2) LPS | LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + Sol. salina |
| (3) BD15 | BD15 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + Sol. salina |
| (4) LPS+ BD15 | LPS (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + BD15 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) |

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

4.4 Preparação de extrato e do homogenato de tecido hipocampal

Para o preparo do extrato e do homogenato do tecido, as amostras de hipocampo foram descongeladas e maceradas em homogeneizador do tipo potter por 20 vezes em 1mL de tampão Tris-HCl (Tris-HCl pH 7,4 0,01M; EDTA 0,5 mM; MgCl_2 1mM). Foi então recolhido 500 μL desse extrato para a extração lipídica. A concentração de proteínas desse extrato foi determinada. O restante foi centrifugado a 10000 g por 20 minutos, a uma temperatura de 4°C . O sobrenadante foi recolhido e armazenado para ensaios de quantificação de peróxido, quantificação de glutathiona reduzida e western blotting. Esse homogenato também teve determinado sua concentração de proteínas totais.

4.5 Preparação de extrato total de células

As células cultivadas para uso nos ensaios de estresse oxidativos foram tratadas e retiradas das placas de cultura com o cell scraper e o pellet foi armazenado em microtubos a -80°C.

Posteriormente, para o preparo do homogenato total, o pellet de cada amostra foi ressuspenso em 500µL de tampão PBS (1x) e coquetel inibidor de protease (1:100) e homogeneizado com pipeta. Depois as amostras foram sonicadas, 3 vezes de 30 segundos em potência de 45%, com intervalo de 30 segundos entre as sonicações, para extração. As amostras foram então separadas em dois microtubos, um dos quais foi feito a dosagem de proteínas por método de Bradford e o outro novamente armazenado em -80°C para os ensaios de quantificação de peróxido de hidrogênio e determinação dos níveis de glutatona reduzida.

4.6 Ensaios de viabilidade celular – MTT e LDH

Foram feitas curvas de viabilidade celular com diferentes concentrações de LPS e BD-15. Para a curva de LPS, usou-se as concentrações de 1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL, seguindo concentrações previamente padronizadas (KINOSHITA *et al.*, 2017) e para a curva de BD-15 foram utilizadas as concentrações de 1 µM, 500 nM, 250 nM, 150 nM, 50 nM, 10 nM e 1 nM. Os pontos da curva de BD15 foram baseados na concentração mais utilizada na literatura, de 150 nM (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019; PESSÔA *et al.*, 2019) para os ensaios de viabilidade, foram plaqueadas 2×10^4 células BV-2 em placas de 48 poços. Após 48 horas, os poços tiveram o meio (meio DMEM suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 1% v/v de antibiótico penicilina-estreptomicina, tamponado com bicarbonato de sódio) retirado e substituído por meio sem 10% v/v de soro fetal bovino com o respectivo tratamento. No dia seguinte, após 24 h, a viabilidade e taxa de metabolismo celular foram medidas por meio dos ensaios de LDH e MTT. Em ambos, o controle do experimento foi o veículo utilizado para diluir a droga, HBSS + DMSO (0,1%).

4.6.1 Ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Nesse experimento é usado o kit de detecção Cytotox96 (Promega, USA), um ensaio colorimétrico que quantifica morte celular e a lise das células a partir da medição indireta da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).

A LDH é uma enzima citosólica que é liberada no meio em células com a membrana plasmática danificada. Essa enzima converte o lactado em piruvato por meio da redução do NAD⁺ para NADPH. A enzima Diaforese oxida o NADPH produzido para a conversão do sal cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio (INT) em Formazan. A coloração característica dessa reação é lida em 590 nm. O nível formado de formazan é proporcional à quantidade de LDH liberada no meio pela célula danificada, sendo, portanto, um indicativo de citotoxicidade (Thermo Scientific LDH Cytotoxicity Assay Kit).

Foram pipetados 50 µL do *substract mix* e 50 µL do sobrenadante da cultura em uma placa de 48 poços, conforme orientação do fabricante. As placas foram incubadas por 30 minutos em abrigo da luz, temperatura ambiente (TA). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. A média da triplicata de cada tratamento foi calculada pelo controle positivo (considerado 100% de morte). O controle positivo desse ensaio consiste em células tratadas com 10% de solução de lise por poço durante 45 minutos.

4.6.2 Ensaio de MTT

No ensaio de MTT, a atividade metabólica das células é quantificada pela capacidade das células em converter o 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium brometo (MTT) em um sal violeta. A morte celular pode ser quantificada indiretamente por esse teste, já que a morte celular está relacionada com a disfunção mitocondrial. Para o ensaio, o meio de cultura com tratamento foi retirado e foi aplicada uma solução de 12 mM de MTT em meio de cultura sem soro. As placas foram incubadas com o MTT por 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, o meio foi retirado e então foi adicionado DMSO, para a dissolução dos cristais de formazan de cor violeta. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem do controle.

4.7 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford, descrito por Dr. Marion Bradford em 1976, através do reagente de Bradford (Bio-Rad), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas. A ligação entre o corante e as proteínas induzem uma mudança espectral da cor inicial marrom para o azul. As

interações hidrofóbicas e iônicas que acontecem entre o corante e a amostra acabam estabilizando o corante em sua forma aniônica e permitindo a subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. Para inferir a concentração de proteínas, fez-se uma curva de concentrações conhecidas da albumina sérica bovina (BSA) variando de 0,25 a 8 µg/µL e a partir das absorbâncias dessas concentrações conhecidas gerou-se uma equação que permite chegar ao valor de concentração das amostras.

4.8 Ensaio de ELISA

Foram feitos ensaios de ELISA para medir os níveis de TNF- α e IL-1b com o meio de cultura das células BV-2 de quatro grupos, apresentados na tabela 2, tratadas por 1 h, utilizando os kits Mouse IL-1β DuoSet ELISA e Mouse TNF-α DuoSet ELISA. As orientações do fabricante foram seguidas.

| Grupo de estudo | Tratamentos |
|-----------------|--------------------------------|
| (1) Controle | HBSS + DMSO (0,1%) |
| (2) LPS | LPS (1 µg/mL) |
| (3) BD15 | BD-15 (150 nM) |
| (4) LPS+ BD15 | LPS (1 µg/mL) + BD-15 (150 nM) |

Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

4.9 Determinação do Teor de Glutaciona Reduzida (GSH)

O princípio da determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente 21 de Ellman (DTNB/ 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) com o tiol livre, originando ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB). O DTNB é um composto que contém um grupo nitrobenzoico (NO₂-Bz) e o grupo tiol (SH). Enquanto a glutaciona reduzida (GSH) contém um grupo tiol (-SH) em sua estrutura. Quando o DTNB é adicionado à solução contendo GSH, ocorre uma reação de substituição nucleofílica entre o grupo tiol (SH) da GSH e o grupo nitrobenzoico (NO₂-Bz) do DTNB. Essa reação resulta na formação do denominado 5-tio-2-nitrobenzoato de glutaciona (TNB-GS).

O 5-tio-2-nitrobenzoato de glutaciona (TNB-GS) formado é um complexo de cor amarela, que pode ser quantificado por meio da medição da absorbância em um espectrofotômetro. A intensidade da cor amarela está diretamente

relacionada à concentração de GSH presente na amostra, permitindo a determinação da concentração de GSH por meio da curva de calibração.

Essa reação é específica para a glutatona reduzida (GSH) e não ocorre com outras formas oxidadas de glutatona. Portanto, esse método é utilizado para medir especificamente a concentração de GSH, que é uma forma importante de antioxidante presente nas células.

Para este ensaio usou-se uma placa de 96 poços, na qual foram aplicados 20 µL das amostras (extrato total de BV-2 e homogenato de hipocampo), 250 µL de tampão Tris-HCl (Tris-HCl 1M pH 8; EDTA 0,1mM) e 5 µL DTNB 10 mM. Para a curva padrão utilizou-se uma solução estoque de cisteína 10 mM que foi aplicada na placa em diluições que garantem concentrações de 0 a 181 µM de cisteína, posteriormente foi adicionado o tampão e 5 µL de DTNB. O branco recebeu apenas 275 µL de tampão e 5 µL de DTNB. Após 15 minutos em temperatura ambiente a placa foi lida em a 412 nm e os dados expressos em nmol de GSH/mg proteína

4.10 Determinação do conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Esse protocolo utiliza o princípio da titulação redox para quantificar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) presente na amostra. O sulfato ferroso amoniacal é um agente redutor que reage com o peróxido de hidrogênio, oxidando-se no processo.

Para a quantificação da produção de H₂O₂ foi adicionado na placa de ELISA 20 µL de extrato total de BV-2 e homogenato de hipocampo, 280 µL de meio de reação (500 µM de sulfato ferroso amoniacal e 200 µM de alaranjado de xilenol diluído em H₂SO₄ 25 mM). A curva foi feita a partir de uma solução de peróxido de hidrogênio 10 nM, com uma concentração variando de 0 a 2,13 nM. O branco recebeu apenas 280 µL de meio de reação e 20 µL de água destilada. Após incubação por 45 minutos sob proteção da luz, o produto formado foi lido em um espectrofotômetro a 580 nm e os dados expressos em µmol de H₂O₂/mg proteína

4.11 Extração Lipídica

Em 150 µL do homogenato total do hipocampo dos ratos foram adicionados 3,8 mL de uma solução de clorofórmio/metanol/água (2/1/0,8 v/v). As amostras foram deixadas no banho de gelo e agitadas vigorosamente no vórtex a cada 5 minutos durante um período total de 1 hora. As amostras foram então

centrifugadas em 3000g por 20 minutos e ao sobrenadante foram novamente adicionados 3,8 mL de uma solução de clorofórmio/metanol/água (2/1/0,8 v/v). O processo de agitação em vórtex e banho de gelo foi feito por mais uma hora.

As amostras foram novamente centrifugadas a 3000g por 10 minutos. Foi então acrescentado 500 µL de clorofórmio em cada uma. Nesse período ocorre a formação de fases, uma fase superior aquosa e uma inferior orgânica. Os tubos foram então deixados em repouso durante a noite a 4°C, para melhor separação das fases. (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). A fase inferior (fase orgânica), corresponde ao extrato contendo os lipídeos de membrana, foi coletada, concentrada em nitrogênio gasoso e ressuspensa em 500 µL de clorofórmio para análise de fosfolipídios totais e colesterol.

4.12 Determinação dos níveis de colesterol

Para a determinação dos níveis de colesterol no extrato lipídico foi utilizado o método de Higgins (1987), baseado na complexação do cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com o colesterol em meio ácido.

Adicionou-se em cada tubo de vidro, uma alíquota de 50 µL do extrato lipídico. Essas amostras foram então secas em corrente de nitrogênio e posteriormente foi adicionado 1,5 mL de ácido acético glacial e 1 mL do Reagente B, composto de 4mL do reagente A (250 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diluído em 10mL de H_3PO_4 85%) diluído em 46 mL de H_2SO_4 pa (98%). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex e mantidos em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente, para formação do complexo. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm, em cubeta de vidro.

A curva padrão foi feita utilizando uma solução padrão de colesterol 1 mg/mL em clorofórmio, variando-se as alíquotas de 0 a 100µL, seguindo o mesmo processo das amostras.

4.13 Determinação do conteúdo de fosfolipídios totais

A determinação do conteúdo de fosfolipídios totais foi determinada utilizando o método de Fiske (1925), que tem como princípio a determinação colorimétrica de fósforo a partir de uma reação de redução do ácido fosfomolibdico para produzir uma cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato.

Uma alíquota de 50 µL das amostras dos extratos lipídicos foi seca em nitrogênio e digerida com 500 µL de ácido nítrico 65 % (v/v) em estufa à

temperatura de 120 °C. Após esse processo, foram acrescentados 680 µL de água destilada e 320 µL da solução de Fiske com molibdato de amônio (1:5). Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex e mantidos em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente, para formação do complexo. A leitura em espectrofotômetro foi feita a 660 nm, em cubeta de vidro.

A curva padrão foi feita a partir de uma solução de 1 µmol/mL com a concentração variando de 0 a 0,3 µmol/mL.

4.14 Ensaio de Western Blotting

O protocolo utilizado para o Ensaio de Western Blotting foi baseado em Laemmli. As concentrações de proteínas foram ajustadas com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromofenol blue; pH 6,8) e após isso as amostras foram fervidas por 5 min a 95°C. Cerca de 20 µg de cada amostra foi aplicado nos poços do gel de SDS-poliacrilamida 10% {acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS}. No primeiro poço desse mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder - Thermo Scientific).

Na eletroforese foi usado um tampão de corrida (25 mM tris-base; 192 mM de glicina, 0,1% de SDS). A corrida foi feita em 90V por 2h. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas, também por eletroforese, para a membrana de nitrocelulose por aproximadamente 1h e 30 min a 400 mA. O tampão de transferência utilizado continha 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada.

Em seguida, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau -S; 5% ácido tricloroacético e água bidestilada), para verificação da eficiência da transferência, e lavadas com água para retirar o excesso de corante. Para bloquear as ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio de TTBS com BSA 5%, por 1 hora.

Ademais, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário de Na,K-ATPase alfa 1 (1:2000, NASE) em TTBS 1% *overnight*, 4°C. As membranas foram lavadas 5 vezes de 5 minutos com TTBS e, incubadas com anticorpo secundário por 2 h, TA, sob agitação e então, lavadas novamente. A revelação foi então feita com o kit de quimiluminescência Elite ECL-Amersham.

Após revelação com ECL, as membranas foram lavadas e então incubadas *overnight* com o anticorpo contra β -actina (1:1000, Santa Cruz) como controle da quantidade de proteínas carregadas. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram lavadas (5 vezes) e então incubadas com o anticorpo secundário (1:1000) por 1 hora. A revelação foi feita com o kit de quimiluminescência Elite ECL-Amersham.

4.15 Análise estatística

Os dados decorrentes do ensaio de MTT e LDH foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Dunnet, para verificar a diferença entre os grupos tratados e o grupo controle. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e os *outliers* detectados pelo programa estatístico GraphPad Prism 9 foram desconsiderados das análises.

Os dados obtidos do ensaio de Western Blot foram analisados por meio da densidade óptica pelo programa “*ImageJ*” (National Institute of Health, USA). Os resultados da análise estatísticas, referentes aos gráficos, foram expressos em média \pm erro padrão da média. Dessa forma, foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido por um teste de Tukey, para verificar a diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$.

Após os ensaios feitos com os Kits de ELISA as leituras foram analisadas e os resultados da análise estatísticas foram expressos em média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguido por um teste de Tukey, para verificar a diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$. Os *outliers* detectados pelo programa estatístico GraphPad Prism 9 foram desconsiderados das análises.

Os resultados obtidos dos ensaios que avaliam parâmetros de estresse oxidativo e composição lipídica também foram analisados estatisticamente e expressos em média \pm erro padrão da média. O teste escolhido também foi ANOVA de uma via seguido por um teste de Tukey, para verificar a diferença estatística entre os grupos, com $P < 0,05$. Os *outliers* detectados pelo programa estatístico GraphPad Prism 9 foram desconsiderados das análises.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com LPS

Devido a necessidade de continuidade do projeto e a dificuldade de obtenção e padronização de resultados reprodutíveis nas amostras de hipocampo utilizados nos ensaios anteriores, optamos por seguir com ensaios utilizando a linhagem de células BV-2. Trata-se de uma linhagem de células de micróglia de origem de tecido cerebral de camundongos transformadas por meio de um retrovírus (SALEPPICO *et al.*, 1996).

Foram realizados ensaios de MTT e LDH nas células BV-2 tratadas por 24h com LPS nas concentrações de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL (figura 13A e 13B) e controle tratado com apenas o veículo de diluição do LPS (HBSS). Essas concentrações foram escolhidas com base na literatura e em trabalhos do grupo, já publicados e padronizados (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013; KINOSHITA *et al.*, 2014; SAADE, 2021). Ademais, para seguirmos de acordo com a pergunta principal do estudo, as concentrações selecionadas tinham como objetivo causar uma inflamação de baixo grau e não morte celular.

No ensaio de MTT, não foi possível observar diferença no metabolismo celular e conseqüente diferença na viabilidade celular. Os dados apresentados, normalizados pelo controle, mostram que os grupos tratados apresentam viabilidade próxima a 100% (figura 13A).

Ademais, na análise da atividade do LDH, obteve-se um resultado que corrobora com o encontrado no MTT. Não houve aumento significativo da atividade dessa enzima quando comparamos o controle aos grupos tratados. Podemos com o conjunto desses resultados inferir que não houve morte celular significativa e que as células continuam com seu metabolismo ativo após o tratamento com as concentrações testadas (figura 13B).

Dados os achados, a concentração de 1 µg/mL foi escolhida para os próximos ensaios, isso porque essa concentração não foi capaz de causar lise celular significativa nas células nem alteração em seu metabolismo e é uma concentração muito utilizada em cultura celular (KINOSHITA *et al.*, 2017; NAM *et al.*, 2018; OKORJI *et al.*, 2016; SAADE, 2021; ZHANG *et al.*, 2019)

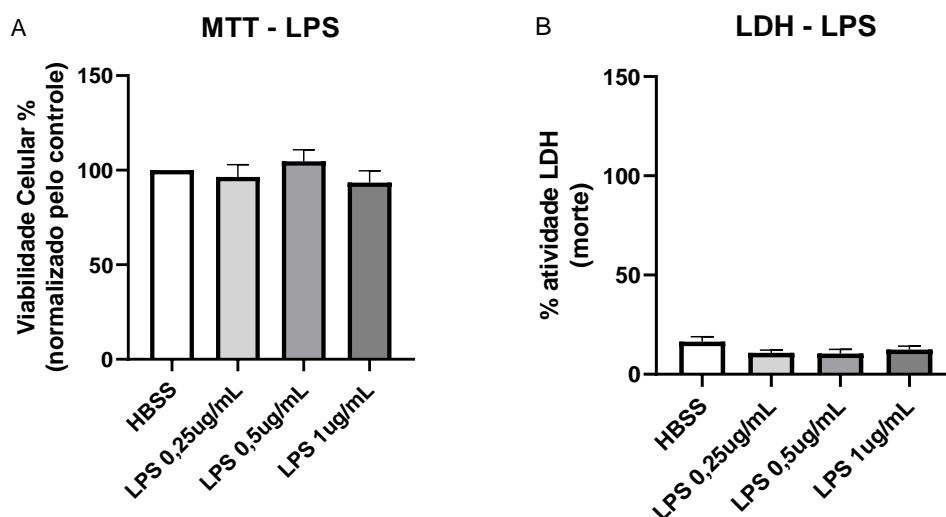


Figura 13 - Gráficos da avaliação de viabilidade e morte celular em resposta ao tratamento com LPS. Porcentagem de viabilidade celular (A) e porcentagem de lise celular (B) em diferentes concentrações de LPS por 24 horas de tratamento. Cada ponto no gráfico representa a média da quintuplicata de 4-7 experimentos individuais. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Dunnett. * $p < 0.05$.

5.2 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com BD-15

A BD-15 é uma droga ainda pouco estudada e, portanto, é necessário a padronização da dose para tratamento em diferentes modelos. Até o presente momento, não existem estudos usando a BD-15 em células BV-2. Sendo assim, foram feitos ensaio de MTT e LDH com diversas concentrações variando em uma faixa de 1 nM a 1 μ M (figura 14A e 14B). O controle utilizado nesse experimento foram células BV-2 tratadas com o veículo de diluição da BD-15, DMSO 0,1%.

Observou-se que nenhuma das concentrações usadas foi capaz de causar uma redução da viabilidade celular significativa. Nota-se que quando comparadas ao controle do experimento de MTT, as concentrações estudadas tem resultados que variam aproximadamente entre 80% e 120% de viabilidade (figura 14A).

No ensaio de LDH, a faixa de concentração usada foi menor devido aos resultados prévios de MTT. Como não havia mudança significativa entre os grupos tratados com as concentrações anteriores, foram usadas as menores concentrações pensando na possibilidade futura de melhor eficácia com uma dose menor. A porcentagem de atividade do LDH foi abaixo de 20% em todos os grupos tratados e não houve diferença significativa em relação a morte celular do controle e os demais grupos experimentais (figura 14B).

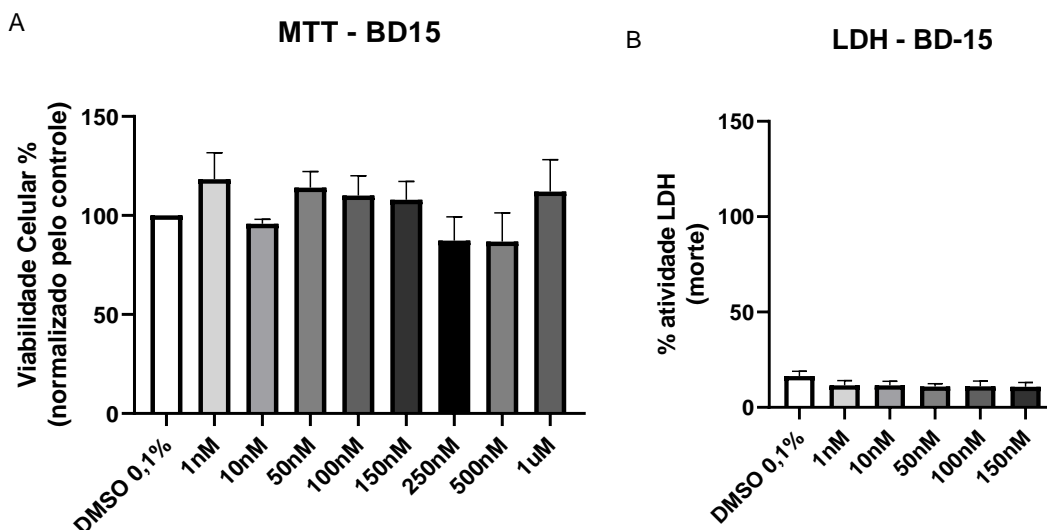


Figura 14 - Gráficos da avaliação de viabilidade e morte celular em resposta ao tratamento com BD-15. Porcentagem de viabilidade celular (A) e porcentagem de lise celular (B) Liberação de lactato desidrogenase em diferentes concentrações de BD-15 após 24 horas de tratamento. Cada ponto no gráfico representa a média da quintuplicata de 4-7 experimentos individuais. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Dunnett. * $p < 0.05$

5.3 Avaliação da viabilidade celular de células BV-2 tratadas com LPS (1µg/mL) e BD-15

Ao estudarmos um composto o qual imaginamos como um possível fármaco, os ensaios iniciais de viabilidade são de grande uso para afinarmos as concentrações estudadas e a partir delas iniciar os estudos de eficácia dessa droga em questão.

Devido ao objetivo geral desse estudo, fez se necessário avaliar a toxicidade da BD-15 nas células estudadas (BV-2) pós uma exposição ao agente inflamatório usado nesse modelo, o LPS. Essa análise é importante também para certificarmos que nas concentrações escolhidas não há toxicidade aditiva entre

os compostos, ou seja, esses estudos são necessários para avaliarmos que diante de um processo inflamatório a BD-15 não é capaz de agravar tal quadro.

Foi então avaliada a viabilidade celular da BV-2 em ensaios de MTT (n=6) utilizando 1 µg/mL de LPS e BD-15 (figura 15A e 15B) com concentrações variando de 500 nM a 1 µM e controle do veículo utilizado para diluir a BD-15 (DMSO 0,1%).

Os resultados encontrados no MTT reafirmam os dados anteriores com tratamentos separados. Nenhuma das concentrações foi capaz de reduzir a viabilidade celular de modo significativo.

As porcentagens de atividade encontradas no ensaio de LDH absolutas são altas em relação as demais tratadas apenas com as drogas separadamente, porém em todos os grupos tratados não houve diferença significativa em relação a morte celular do controle e os demais grupos experimentais.

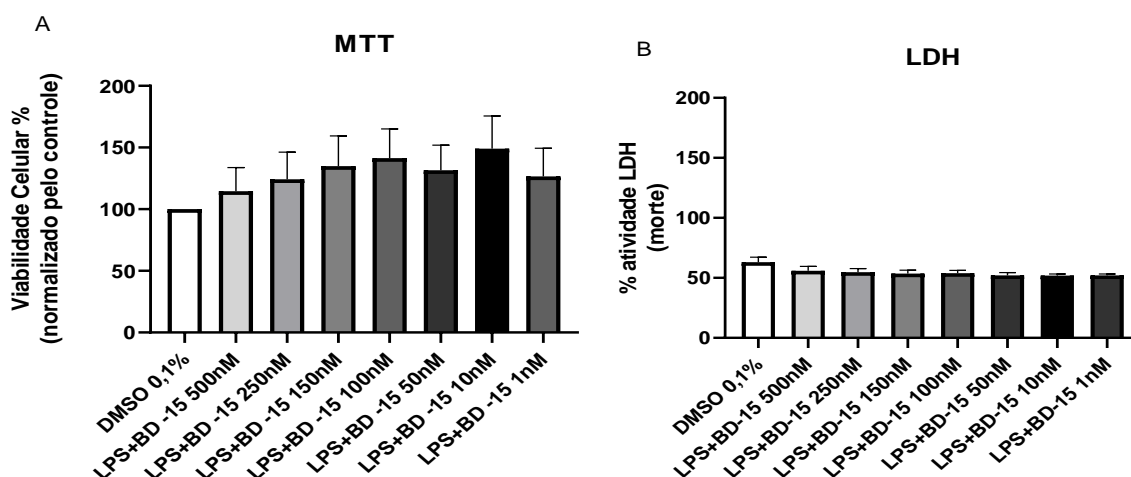


Figura 15 - Gráficos da avaliação de viabilidade e morte celular em resposta ao tratamento com LPS e BD-15. Porcentagem de viabilidade celular (A) (n=6) e porcentagem de lise celular (B) (n=4) em diferentes concentrações de LPS + BD-15 após 24 horas de tratamento. Cada ponto no gráfico representa a média de 4-7 experimentos individuais. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Dunnett.

Isto posto, decidimos seguir com os próximos ensaios com a concentração de 1 µg/mL de LPS e 150 µM de BD-15, já que estudo anterior mostrou resultados satisfatórios com essa concentração de BD-15 (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019)

5.4 Avaliação pelo método de ELISA de níveis das citocinas pró inflamatórias TNF- α e IL-1 β in vitro

Conforme descrito no item 4.8, foram realizados testes com meio de cultura de células BV-2 tratadas por 1 h, seguindo todas as recomendações e instruções do fabricante do kit.

No ensaio para averiguar os níveis de TNF- α observamos um aumento significativo na liberação dessa citocina nas células tratadas com LPS tanto em relação ao controle quanto em relação ao grupo tratado apenas com a BD-15. Esse resultado sugere que o tratamento com LPS foi efetivo para produzir uma inflamação e que a BD-15 sozinha não causou alteração na liberação dessa citocina.

Não foi possível observar diferença significativa entre o grupo tratado apenas com LPS e o grupo tratado com LPS e BD-15, no entanto é possível notar uma tendência a diminuição (figura 16A).

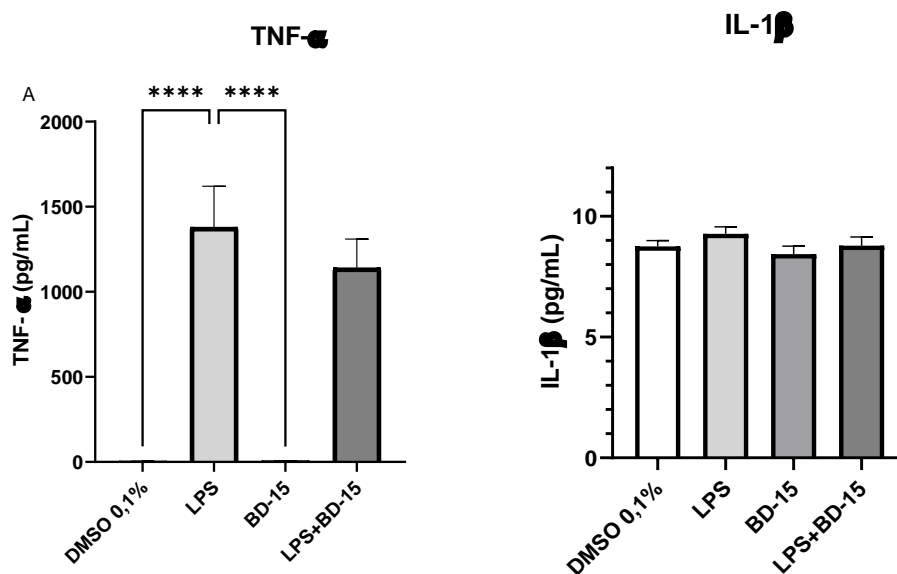


Figura 16 - Avaliação do nível extracelular da citocina pró inflamatória TNF- α (A) e IL-1 β (B). Foram quantificados os níveis de TNF- α (n=6) e IL-1 β (n=8) liberados para o meio extracelular após o tratamento. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. **** = $p < 0.05$

Quanto aos níveis de IL-1 β não houve diferença significativa em nenhum dos grupos, porém é mantido o perfil encontrado no TNF- α (figura 16B).

5.5 Determinação do Teor de Glutaciona Reduzida (GSH) e conteúdo Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) *in vitro*

Dois parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram analisados nas células BV-2 frente ao tratamento de 1 hora com o LPS e/ou BD-15, a quantificação de GSH (figura 17A) e de H₂O₂ (figura 17B). O primeiro parâmetro considerado como uma proteína antioxidante, enquanto o segundo indica altas quantidades de EROs e conseqüentemente um desbalanço que pode levar a danos celulares.

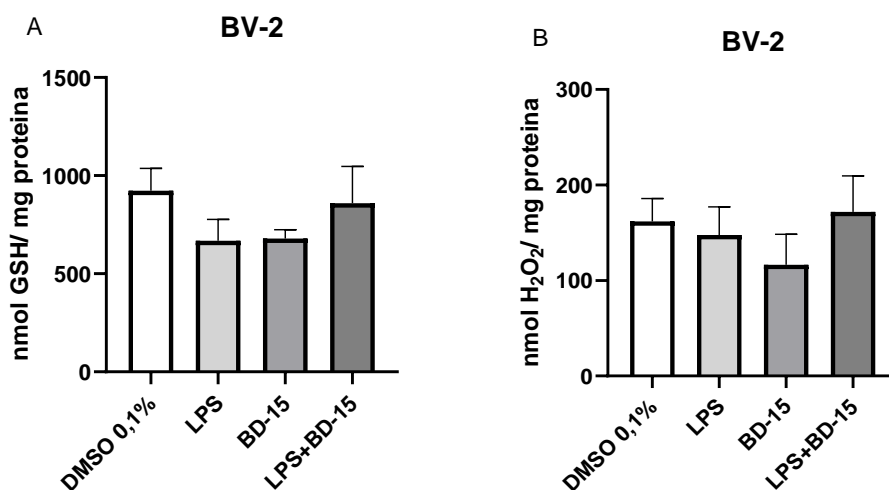


Figura 17 - Determinação do teor de glutaciona reduzida (GSH) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) *in vitro*. Foram analisados os homogenatos de BV-2 (n=4) obtidos a partir do tratamento de 1 hora e para cada grupo (DMSO 0,1%, LPS, BD-15 e LPS+BD-15) os resultados foram expressos em nmol de GSH/ mg de proteína (A) e em nmol de H₂O₂/ mg de proteína (B). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. **** = p<0.05

Ao analisarmos os dados, observamos uma diminuição no conteúdo de GSH para os tratamentos apenas com LPS e com BD-15, mas não de maneira significativa. Adicionalmente, observa-se que o tratamento com LPS seguido da aplicação de BD-15 tem uma quantidade de GSH próxima ao controle do experimento, sugerindo que a BD-15 pode ter uma ação na recuperação dos níveis dessa proteína antioxidante (figura 17A).

Observando o segundo gráfico (figura 17B), que avalia o teor de peróxido de hidrogênio, não notamos diferença significativa em nenhum dos grupos, porém nota-se que o tratamento com a BD-15 possui uma tendência a redução dessa espécie reativa de oxigênio.

Devido à baixa concentração de proteína nas amostras as quais poderiam estar causando uma variabilidade maior entre os experimentos decidimos continuar, em paralelo com a obtenção de novas amostras celulares, as análises de parâmetros oxidativos e de lipídios em hipocampus de animais tratados com os mesmos compostos, seguindo os mesmos grupos, porém com duas horas de tratamentos.

5.6 Determinação do Teor de Glutathiona Reduzida (GSH) e conteúdo Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) *in vivo*

Os mesmos parâmetros relativos ao estresse oxidativo foram analisados nos homogenatos dos quatro grupos de animais, a quantificação de GSH (figura 18A) e de H₂O₂ (figura 18B).

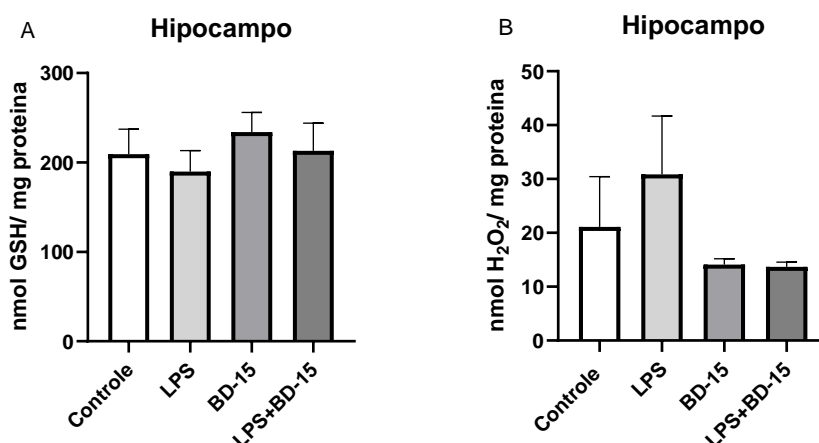


Figura 18 – Determinação do teor de glutathiona reduzida (GSH) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) *in vivo*. Os homogenatos de hipocampo dos animais tratados por 2 horas foram analisados e para cada grupo (n=6) os resultados foram expressos em nmol de GSH/ mg de proteína (A) e em nmol de H₂O₂/ mg de proteína (B). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. **** = p<0.05

Em nenhum dos ensaios foi possível observar uma diferença significativa entre nenhum dos grupos. Todavia, nota-se novamente um perfil o qual há uma diminuição no conteúdo de GSH para os tratamentos apenas com LPS, assim como um aumento na quantidade de peróxido desse mesmo grupo.

Ademais, os grupos tratados com BD-15 e LPS+BD-15 possuem um perfil de aumento de GSH e diminuição do peróxido de hidrogênio, mostrando um equilíbrio maior do sistema antioxidante.

5.7 Análise do conteúdo de fosfolípidios totais e colesterol *in vivo*

Tendo em vista que alguns esteroides cardiotônicos podem alterar a composição lipídica das células e inclusive modular a fluidez da membrana plasmática, investigamos se o tratamento com LPS e/ou BD-15 por 2 horas teriam esse efeito no hipocampo dos animais tratados.

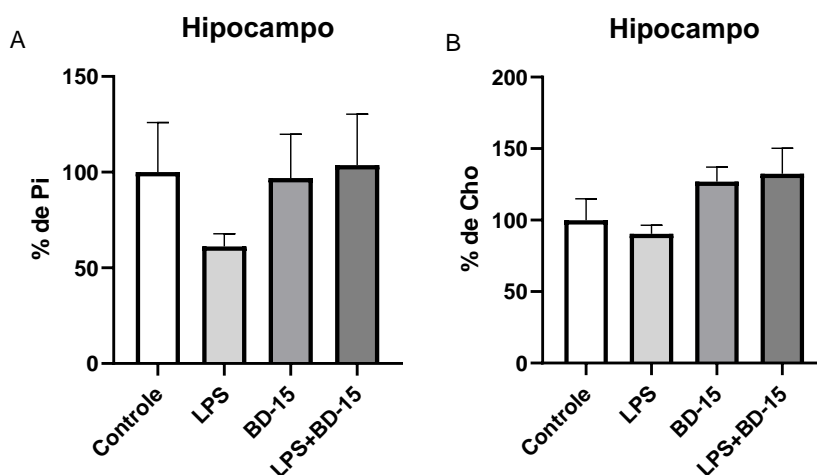


Figura 19 – Análise do conteúdo de fosfolípidios totais e colesterol *in vivo*. Foram quantificados os níveis de fosfolípidios totais (n=3) por meio do método de Fiske (A) e níveis de colesterol (n=3) por meio do método de Higgins (B) nos extratos lipídicos de hipocampo dos animais tratados por 2 horas. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Tukey. **** = $p < 0.05$

Não é possível observar diferença significativa entre nenhum dos grupos, porém observamos uma tendência de redução no conteúdo total de fosfolípidios nos hipocampos de animais tratados com LPS em relação ao controle. O grupo tratado apenas com a BD-15 não parece ter seu conteúdo de fosfolípidios alterados em relação ao controle, assim como o tratado com LPS e BD-15, contudo, o fato do grupo tratado apenas com LPS mostrar a tendência a diminuição, podemos inferir que neste caso a BD-15 possa ter interferido na quantidade total de fosfolípidios (figura 19A). Tais resultados poderão ser melhor analisados com o aumento do número de animais utilizados.

A avaliação de conteúdo de colesterol é um dado capaz de complementar os estudos sobre a composição lipídica das amostras em questão, além de oferecer novos dados sobre a ação da BD-15.

É perceptível que em ambos os grupos tratados com a BD-15, com LPS ou não, obtivemos um aumento de aproximadamente 40% de colesterol na composição do extrato lipídico. Enquanto o grupo tratado apenas com LPS não

possui diferença em relação ao controle. Apesar destes dados não apresentarem significância estatística, a tendência desses resultados deve se manter com o aumento de animais nos grupos desse experimento (figura 19B).

5.8 Análise dos níveis de expressão da isoforma $\alpha 1$ da Na,K-ATPase

Foram realizados os primeiros ensaios de Western Blotting para avaliar a expressão da isoforma $\alpha 1$ da NKA com os grupos de animais Controle, LPS, BD-15 e LPS + BD-15 (figura 20).

Observamos uma tendência de aumento da expressão dessa isoforma nos grupos tratados apenas com LPS ou LPS+BD-15, porém esse experimento deve ser feito com mais animais para tornar-se conclusivo.

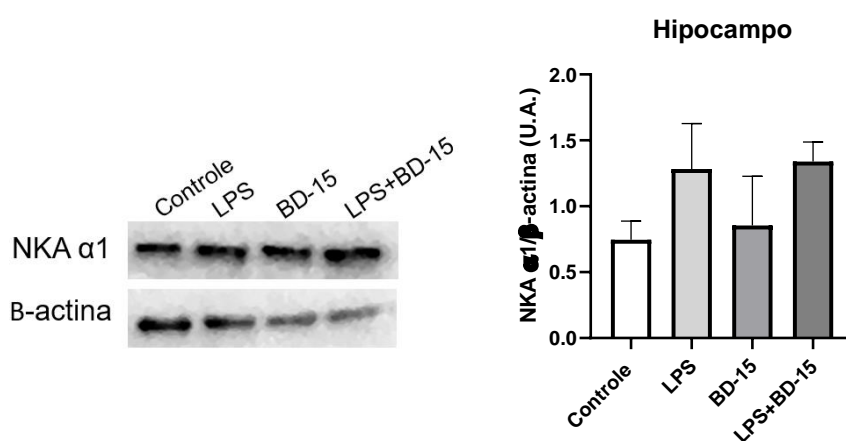


Figura 20 - Avaliação dos níveis de expressão da isoforma $\alpha 1$ da Na,K-ATPase em extrato de hipocampo de ratos Wistar. (A) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti- NKA $\alpha 1$ e anti- β -actina. (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de NKA $\alpha 1$ para cada grupo, os níveis foram normalizados pela β -actina (n=2). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média.

6. DISCUSSÃO

A BD-15 é um análogo da digoxina que surge como uma molécula moduladora da atividade da NKA com maior afinidade pelas isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 3$ e sendo capaz de estimular apenas a isoforma $\alpha 3$, que é principalmente presente em neurônios. Além disso, estudos de nossos colaboradores, em modelo de isquemia química, mostraram aumento da atividade da NKA, efeitos neuroprotetores e diminuição na peroxidação lipídica.

Apesar de se tratar de células imortalizadas, a BV-2 é um modelo interessante para estudo acerca de vias de inflamação (HENN *et al.*, 2009).

Essa linhagem é frequentemente usada como alternativa para a cultura primária de micróglia em estudos farmacológicos (LUND *et al.*, 2005, 2006) e devido a isso, vários estudos tem utilizado a comparação entre as respostas da cultura primária de micróglia e a cultura de BV-2 (SAADE *et al.*, 2021). O LPS na BV-2 foi capaz de promover a translocação do NF- κ B e a secreção de IL-6 (HENN *et al.*, 2009). Esse mesmo estudo mostrou que cerca de 90% dos genes ativados por LPS na BV-2 eram também encontrados em micróglias de cultura primária sob o mesmo estímulo e 50% deles foram encontrados em camundongos tratados com LPS intracerebroventricular (HENN *et al.*, 2009).

Os ensaios de MTT e LDH feitos com diferentes concentrações de LPS e BD-15 foram necessários para padronizar os experimentos realizados. Existem vários estudos farmacológicos citando o uso do LPS como indutor de inflamação tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro* (BADSHAH *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2017; LOPES, 2016; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016; OKORJI *et al.*, 2016; SALEPPICO *et al.*, 1996). Apesar dos dados encontrados na literatura, são diversas as variáveis relacionadas a resposta celular a um composto. Pensando nisso a curva de concentração foi feita com três pontos. A concentração de 1 μ g/mL é a mais encontrada na literatura e acrescentamos mais dois pontos (0,5 e 0,25 μ g/ml) para garantir a não toxicidade do LPS, apenas seu efeito pró-inflamatório. O LPS não foi tóxico em nenhuma das concentrações, esse resultado corrobora com a literatura e com dados já bem estabelecidos em nosso grupo de pesquisa (KINOSHITA *et al.*, 2014, 2017; NAM *et al.*, 2018; SAADE *et al.*, 2021).

A digoxina é um esteroide cardiotônico conhecido por seu perfil complexo, janela terapêutica baixa e alta toxicidade. A droga utilizada nesse projeto, BD-15, é um análogo a digoxina que foi sintetizado a fim de viabilizar uma droga que tivesse efeitos parecidos, com melhor eficácia, menor toxicidade, além de permitir o uso em outras enfermidades. Por ser um composto novo, pouco ainda se conhece sobre as suas interações e não há muitas informações na literatura. Contudo, experimentos já feitos por nossos colaboradores mostraram que a BD-15 é pouco citotóxica inclusive em concentrações mais altas (VALADARES *et al.*, 2021). Corroborando com os achados, a BD-15 não foi capaz de causar na BV-2 morte celular significativa em nenhuma das concentrações testadas.

Diante deste resultado, testamos as concentrações na faixa de 500 nM a 1 nM de BD-15 agora como tratamento prévio com LPS (1µg/ml) com o intuito de avaliarmos qual das concentrações será a mais viável para darmos continuidade ao projeto, além de garantirmos que a BD-15 não causaria um efeito aditivo ao efeito do LPS. Essas concentrações foram escolhidas levando em consideração a origem da molécula e o que já encontramos na literatura sobre modulação de via de sinalização por meio de esteroides cardiotônicos (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013; KINOSHITA *et al.*, 2014; NESHER *et al.*, 2007; ORELLANA *et al.*, 2016; OSELKIN; TIAN; BERGOLD, 2010; XIE; ASKARI, 2002).

De acordo com os dados encontrados o tratamento com a BD-15 consecutivo ao tratamento com LPS não foi capaz de causar uma redução significativa na viabilidade celular da linhagem em questão. Sendo assim, escolhemos a concentração de 150 nM para continuarmos o estudo, já que essa concentração mostrou em estudos passados uma ação neuroprotetora, diminuição na peroxidação lipídica, além de manter a atividade da NKA (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019).

No presente estudo não foi possível verificar os níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β nas amostras de hipocampo, porém seguimos com esse ensaio com amostras das culturas celular de BV-2.

O TNF- α é uma citocina multipotente que está relacionada com a via de inflamação e apoptose. Essa citocina é uma das principais a serem encontradas no processo inflamatório ou de lesão tecidual (LAWRENCE, 2009). São dois os receptores de membrana de TNF, o receptor 1 (TNFR1) e o receptor 2 (TNFR2). O receptor O TNFR1 é responsável por induzir a apoptose a partir da formação

de um complexo proteico recrutando a proteína adaptadora FADD e caspase-8. A ativação desses mecanismos de receptores de membrana de apoptose envolvem complexos de sinalização de morte intracelular, como por exemplo a proteína ativadora 1 (AP-1), NF- κ B e caspases. Devido a essa relação direta, estudos correlacionam a quantidade de mRNA de TNF- α com apoptose de neurônios hipocampais. (LYMAN *et al.*, 2014; SHABAB *et al.*, 2017).

A IL-1 β faz parte de uma família de proteínas essenciais para orquestrar respostas imunes e inflamatórias a lesões e infecções, as IL-1. Essa interleucina exerce suas ações por meio do receptor IL-1 do tipo I (IL-1RI) e é inibida pelo antagonista endógeno do receptor IL-1 (IL1RA). A IL-1 β é a forma secretória principal dessa família e é relatada por ter ações neurotóxicas (SIMI *et al.*, 2007).

Estudos do nosso grupo de pesquisa sugerem uma correlação entre a modulação da atividade da NKA pela OUA e o TNF- α . Em cultura primária de neurônios cerebelares de rato tratadas com OUA, tanto o TNF- α quanto o IL-1 β tiveram seus níveis de mRNA aumentados após 2h de tratamento. O resultado do TNF- α repetiu-se em estudos feitos por Kawamoto *et al.* (2012) em hipocampos de ratos após 1h da administração de OUA (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013; KAWAMOTO *et al.*, 2012).

Quando ratos foram tratados com OUA e desafiados com LPS, houve uma diminuição nos níveis de TNF- α nos grupos que receberam a OUA antes da injeção de LPS, após 2 h. Foi feita também a avaliação do IL-1 β e observou-se um aumento na sua expressão após o tratamento com LPS, e uma diminuição quando os animais receberam o tratamento com OUA (KINOSHITA *et al.*, 2014).

Nesse estudo, obtivemos uma diferença significativa nos níveis de TNF- α encontrados nos grupos tratados com LPS (LPS e LPS+BD-15), em relação ao grupo controle tratado apenas com o veículo ou com BD-15. No entanto, quando comparamos esses grupos entre si, não encontramos uma diferença estatisticamente significante, apesar de notarmos uma tendência a diminuição nos níveis do grupo LPS+BD-15, o que parece ser um resultado promissor que deve ser explorado futuramente em nossos estudos. A presença da BD-15 no grupo LPS+BD-15 pode não ter um efeito significativo em relação ao grupo LPS, uma vez que, em estudos anteriores, a BD-15 parece modular principalmente a atividade da subunidade alfa 3 (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019; PESSÔA

et al., 2018), que não são predominantes nas micróglia, que é o caso da linhagem BV-2 (KINOSHITA *et al.*, 2014).

A presença da BD-15 no grupo LPS+BD-15 pode não ter um efeito significativo em relação ao grupo LPS, uma vez que, em estudos anteriores, a BD-15 parece modular principalmente a atividade da subunidade alfa 3, que não são predominantes nas micróglia, que é o caso da linhagem BV-2.

Para futuros estudos envolvendo o composto BD-15 e a modulação da atividade da NKA nessa linhagem celular, seria interessante avaliar a expressão de todas as isoformas da NKA presentes nas células BV-2, assim como investigar as atividades específicas dessas isoformas na presença e na ausência do BD-15. Isso poderia fornecer uma compreensão mais completa do modo como o composto afeta a atividade da NKA nessas células específicas.

Essa reformulação busca simplificar e clarificar a explicação anterior, destacando a falta de efeito direto do BD-15 nas células BV-2 e sugerindo uma abordagem futura para melhor entender o papel do composto na modulação da atividade da NKA nessas células.

Nesta mesma análise, nossos dados mostram que o grupo tratado apenas com a BD-15 não obteve modulação do TNF- α , um efeito diferente do descrito na literatura para a OUA. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram a OUA em diferentes modelos aumentando a expressão de TNF- α .

Em Kinoshita e colaboradores (2014), uma análise em hipocampo de ratos wistar tratados com OUA (1,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) observou que essa dosagem foi capaz de aumentar a expressão de TNF- α significativamente. Outro estudo em hipocampo, observou níveis aumentados de mRNA dos genes não só do TNF- α , como também do BDNF e iNos (KAWAMOTO *et al.*, 2012; KINOSHITA *et al.*, 2014). Ademais, em culturas neuronais primárias do cerebelo de ratos, o NF- κB ativado pela OUA resultou em um aumento nos níveis de mRNA de TNF- α , Il-1 β e do BDNF (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013).

Assim, se confirmados os efeitos protetores da BD-15, esses podem envolver outros mecanismos neuroprotetivos, diferentes dos conhecidos da OUA. Para estudos futuros seriam interessantes buscar novos modelos comparativos, assim como a possibilidade de desenvolvimento de novos análogos que possuam um perfil semelhante a própria OUA.

Ao mensurarmos a concentração de IL-1 β em nossas amostras de sobrenadante celular obtivemos um perfil que corrobora com os dados obtidos no imunoensaio de níveis de TNF- α , porém com níveis de concentração próximos a 10 pg/mL, o que pode ser considerado baixo para o perfil de inflamação o qual sugerimos no modelo.

Um estudo científico com intuito de determinar os perfis de citocinas e quimiocinas no soro com uma única injeção de LPS e com múltiplas injeções de LPS, comparou os níveis de citocinas e quimiocinas em 0, 4 e 28 horas após uma única injeção de LPS com três injeções de LPS ao longo de um período de 24 horas. A IL-1 β mensurada mostrou-se aumentada somente a partir da medição de 4 horas, sendo que no tempo 0 a dosagem foi nula e quando comparada com a dosagem das amostras após 3 injeções há um aumento em relação aos demais devido ao longo tratamento (ERICKSON; BANKS, 2011). Em um outro estudo, Nam e colaboradores (2018) usaram o modelo de inflamação induzida por LPS por 24h em células BV-2 e por meio de imunoensaio obtiveram a dosagem de IL-1 β de aproximadamente 0,2 pg/mL no controle e cercar de 80 pg/mL no grupo tratado com LPS (NAM *et al.*, 2018).

Sendo assim podemos dizer que a baixa dosagem dessa citocina encontrada no presente projeto pode ter como causa o tempo de tratamento com LPS, já que diversos estudos na literatura se utilizam de tempos de tratamento com LPS maiores, variando de 2 a 24h de tratamento para avaliação de inflamação aguda (DE SÁ LIMA *et al.*, 2013; KAWAMOTO *et al.*, 2012; KINOSHITA *et al.*, 2014; NAM *et al.*, 2018; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016).

A fim de explorar melhor o modelo e quais as consequências do tratamento com a BD-15, assim como o tratamento concomitante com LPS, iniciamos uma análise de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Primeiramente, analisamos o conteúdo de GSH e de H₂O₂. O GSH é um tripeptídeo conhecido por sua já estabelecida função de antioxidante. Essa molécula é responsável por doar elétrons aos EROs com o objetivo de neutralizá-los e prevenir que esses radicais causem uma disrupção no equilíbrio oxidativo do ambiente celular (BALLATORI *et al.*, 2009; TANCHEVA *et al.*, 2020). Em contrapartida, o H₂O₂ é produzido a uma taxa de 1 a 4% do consumo de O₂ e, portanto, representa uma carga oxidante significativa, sendo responsável por grande parte do estresse oxidativo celular e um aumento no seu conteúdo pode

levar a inúmeros danos celulares, como danos em proteínas, DNA e membrana celular (JONES, 2008; TELEANU *et al.*, 2022).

Na literatura, um estudo feito em hipocampo de ratos tratados com LPS e OUA, observou uma redução significativa do GSH nos grupos de animais tratados com LPS em relação ao controle não tratado. Esse mesmo estudo mostrou um aumento significativo de H₂O₂ nesse mesmo grupo em relação ao controle (GARCIA *et al.*, 2017).

Estudos que usaram amostras de hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com LPS como modelo de indução de sintomas de depressão, mostraram resultados semelhante. O LPS reduziu significativamente o GSH acompanhado por um aumento na peroxidação lipídica em relação as amostras de hipocampo dos animais controles (JANGRA *et al.*, 2014; SULAKHIYA *et al.*, 2015; TANIGUTI *et al.*, 2018).

Nossos dados *in vitro* mostram uma diminuição no conteúdo de GSH para os tratamentos apenas com LPS e com BD-15, mas não de maneira significativa. O tratamento com LPS seguido da aplicação de BD-15 tem uma quantidade de GSH próxima ao controle do experimento, sugerindo que a BD-15 pode ter uma ação na recuperação dos níveis dessa proteína antioxidante.

Ao avaliarmos o teor de peróxido de hidrogênio, ainda nas amostras de BV-2, não obtivemos diferença significativa em nenhum dos grupos, e não é possível notar uma tendência ao aumento do peróxido de hidrogênio no grupo tratado com LPS.

Apesar de não termos observado diferença nesses resultados, a BD-15 mostrou, em estudo anterior utilizando a mesma concentração em células Neuro-2A em um modelo de isquemia, uma diminuição no conteúdo de H₂O₂ (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019).

Acreditamos que esses resultados incongruentes com a literatura possam ser devido à baixa concentração de proteína nas amostras as quais poderiam estar causando uma variabilidade maior entre os experimentos.

Em paralelo com a obtenção de novas amostras celulares para conclusões mais fundadas sobre os dados que obtivemos até o presente, decidimos dar continuidade as avaliações de alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e possíveis modulações do perfil lipídico da BD-15 no SNC, usaremos amostras hipocampais de ratos tratados com LPS e BD-15 por 2 horas que foram doadas

ao nosso grupo pela professora Dra. Herica de Lima Santos e pelo professor Dr. Leandro Augusto Barbosa, ambos da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ).

Em contraste com os estudos *in vitro*, as análises de GSH e H₂O₂ *in vivo* apresentam maior consistência com os perfis previamente descritos na literatura.

No ensaio de teor de GSH *in vivo*, obtivemos um perfil o qual o GSH está reduzido no grupo tratado apenas com LPS, enquanto o grupo co-tratado com LPS e BD-15 mantém o perfil próximo ao controle. Ademais, o grupo com apenas a BD-15 possui uma tendência de aumento em relação ao grupo controle sem tratamento.

O GSH, as enzimas dependentes de GSH e a regulação redox, são considerados elementos-chave de processos como a regulação de apoptose, podendo influenciar a expressão e a atividade de caspases e na proteção antioxidante contra a neurodegeneração. A desregulação da rede antioxidante baseada em GSH de qualquer forma pode contribuir para o início e a progressão das doenças neurodegenerativas (JOHNSON; WILSON-DELFOSSE; MIEYAL, 2012; LU, 2009; ZEEVALK; RAZMPOUR; BERNARD, 2008).

No SNC, a GSH possui um grande destaque para além de sua ação antioxidante, já que é composta por três aminoácidos, sendo dois deles, o glutamato e a glicina, funcionam em alguns casos como neurotransmissores excitatórios e inibitórios, respectivamente. Ademais, a cisteína, o outro aminoácido formador, possui um efeito excitatório no receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA). Sendo assim, a diminuição da GSH pode ser correlacionada a uma redução nos níveis desses neurotransmissores, o que pode levar à diminuição de processos de formação de memória e aprendizado (JOHNSON; WILSON-DELFOSSE; MIEYAL, 2012; LU, 2009; ZEEVALK; RAZMPOUR; BERNARD, 2008).

Algumas análises em tecidos cerebrais, células linfoblastoides e sangue de pacientes com doença de Parkinson relataram níveis reduzidos de GSH e uma diminuição na relação GSH/GSSG em comparação com controles saudáveis (BLESA *et al.*, 2015; COLAMARTINO *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-FRAGUELA *et al.*, 2018).

Adicionalmente, estudos feitos em camundongos nos quais os níveis neuronais de GSH foram mantidos pelo tratamento com N-acetil cisteína (NAC),

um precursor permeável às células do GSH, apresentaram redução do estresse oxidativo neuronal e da morte neuronal no hipocampo após isquemia/reperfusão (WON *et al.*, 2015).

Existem poucos estudos na literatura que demonstram diminuição de estresse oxidativo pelos esteroides cardiotônicos. O trabalho de Silva e colaboradores (2017), demonstrou que o tratamento com digoxina e a 21-BD, precursora da BD-15, provocou uma redução nos níveis de lipoperoxidação em células da linhagem HeLa (SILVA *et al.*, 2017). Um outro artigo publicado por nossos colaboradores, observou-se que o pré-tratamento com OUA levou à atenuação dos efeitos provocados pelo LPS em cerebelos e hipocampo de ratos (GARCIA *et al.*, 2017, 2018)

Desta forma, a partir desses dados podemos inferir que há uma tendência no tratamento com a BD-15 em modular o teor GSH, evitando possivelmente a sua diminuição induzida pelo LPS em hipocampo de ratos e conseqüentemente favorecendo um efeito neuroprotetor.

Corroborando com esses dados, o ensaio de quantificação de H₂O₂ nas mesmas amostras indicam um teor maior de peróxido de hidrogênio no grupo tratado com LPS, em contraponto com os demais grupos que apresentam conteúdo similar ao controle. Embora as diferenças estatísticas entre os grupos não sejam significativas, o perfil desses estudos é condizente com trabalhos já expostos na presente discussão, assim como em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Esse resultado pode indicar um aumento da produção de EROs e, conseqüentemente, um aumento do estresse oxidativo. Outro fato, já exposto neste trabalho, é que o LPS provoca um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , entre outras (GODBOUT *et al.*, 2005; KINOSHITA *et al.*, 2014; NAVA CATORCE; GEVORKIAN, 2016). Essas características estão intimamente relacionadas a doenças neurodegenerativas e se interrelacionam.

Em Fischer e Maier (2015) os autores discutem essa correlação revisando diversos artigos que mostram que a geração excessiva de EROs causa danos neuronais, liberando fatores citosólicos responsáveis por ativar astrócitos e micróglia. Essas células, por sua vez, respondem à liberação de citocinas pró-

inflamatórias, promovendo uma resposta inflamatória e exacerbando os danos que já estavam sendo causados aos neurônios (FISCHER; MAIER, 2015).

Diante do contexto apresentado, esses resultados sugerem que o LPS foi eficaz em induzir um desafio inflamatório, assim como indicam uma ação de neuroproteção a partir da recuperação do balanço dos sistemas antioxidantes e conteúdo de EROs.

No cérebro, os lipídeos são os compostos orgânicos mais abundantes e mudanças na sua concentração, organização e metabolismo, estão intimamente associadas a diversas doenças neuronais (LAUWERS; GOODCHILD; VERSTREKEN, 2016). Levando-se em consideração que o processo oxidativo no SNC tem como principal alvo os lipídeos de membranas (FANTINI; YAH, 2015b) e que na literatura é possível encontrar achados sobre alguns esteroides cardiotônicos alterando a composição lipídica de tecidos e modulando a fluidez da membrana plasmática (DE SOUZA GONÇALVES *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2017, 2018; MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006; SILVA *et al.*, 2017). O presente trabalho buscou explorar o conteúdo de fosfolipídios totais e colesterol, além da relação entre esses lipídios, nas amostras de hipocampo.

Os dados obtidos sobre o teor de fosfolipídios totais e colesterol no presente trabalho acumulam informações sobre os efeitos dos esteroides cardiotônicos na modulação lipídica de hipocampo de ratos. Não foi possível observar diferença significativa entre nenhum dos grupos, porém observamos uma tendência de redução no conteúdo total de fosfolipídios nos hipocampos de animais tratados com LPS em relação ao controle. De acordo com Catalá (2009) o tratamento com LPS aumenta a produção de EROs, o que proporciona uma peroxidação lipídica acentuada que, por sua vez, pode provocar uma diminuição do conteúdo lipídico (CATALÁ, 2009).

Além disso, em nosso estudo o grupo tratado apenas com a BD-15 não parece ter seu conteúdo de fosfolipídios alterados em relação ao controle, assim como o tratado com LPS e BD-15, contudo, o fato do grupo tratado apenas com LPS mostrar a tendência a diminuição, podemos inferir que neste caso a BD-15 possa ter interferido na quantidade total de fosfolipídios.

A avaliação de conteúdo de colesterol complementa os estudos sobre a composição lipídica das amostras utilizadas no trabalho em questão, além de oferecer novos dados sobre a ação da BD-15. Ambos os grupos tratados com a

BD-15, com LPS ou não, obtiveram um aumento de aproximadamente 40% de colesterol na composição do extrato lipídico. Enquanto isso, o grupo LPS não possui diferença em relação ao controle.

Em análise da literatura, estudos sobre a oleandrina, mostram que esse esteroide cardiotônico causou alteração da fluidez e da microviscosidade da membrana plasmática em diversas linhagens celulares. Os autores sugerem que esse efeito pode ser devido a estrutura química da oleandrina que possui um núcleo esteroidal. Esse núcleo, presente também na BD-15, poderia interagir diretamente com os lipídios da membrana e assim alterar a fluidez (MANNA; SREENIVASAN; SARKAR, 2006).

Em Garcia e colaboradores (2015, 2017, 2018), estudos feitos em amostras de hipocampo e cerebelo de ratos machos Wistar mostraram que o tratamento com ouabaína provoca modulação da composição de fosfolipídios, e colesterol gangliosídeos totais. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa mostrou que *in vitro*, em cultura de células HeLa, o tratamento com 50 μ M de BD-21, precursor da BD-15, causou o aumento do conteúdo de colesterol e fosfolipídios totais da membrana plasmática (GARCIA *et al.*, 2015, 2017, 2018; SILVA *et al.*, 2017). As mudanças no conteúdo total de colesterol podem ocorrer devido a alterações nas taxas de síntese da molécula, bem como a flutuações na atividade da enzima 24-hidroxilase (CYP46) e nos transportadores de membrana responsáveis pela sua metabolização e remoção das células neuronais (GARCIA *et al.*, 2015). Nos demais estudos citados os autores estão aprofundando mais os estudos para elucidar como isso acontece.

No entanto, estudos feitos com a OUA e a digoxina mostraram um aumento da síntese de colesterol em células HepG2, derivadas do fígado humano, quando administradas em concentrações variando de 1 nM a 1 mM. Esses estudos exibiram uma regulação positiva da atividade da HMG-CoA redutase (HMGCR) e sugeriram, assim como em Manna e colaboradores (2006) que os esteroides cardiotônicos poderiam ser potenciais moduladores da síntese de colesterol devido à natureza esteroidal de sua estrutura principal (CAMPIA *et al.*, 2009).

As proteínas integrais de membrana possuem sua atividade e integridade atreladas ao microambiente lipídico. Modificações das interações entre os fosfolipídios de membrana e a proteína podem afetar o funcionamento geral dessas proteínas. Sabe-se que a NKA possui três sítios específicos de ligação à

fosfolipídios e colesterol e que sua atividade é modulada por interação com lipídios anulares à enzima (CORNELIUS *et al.*, 2015; DE LIMA SANTOS *et al.*, 2005; YONEDA *et al.*, 2014)

A fosfatidilserina e o colesterol, encontrados no sítio A, são responsáveis por manter a estabilidade da enzima na membrana, enquanto a fosfatidilcolina poli-insaturada e fosfatidiletanolamina, no sítio B, estimulam a atividade da enzima por meio da aceleração no processo de mudança conformacional de E1P para E2P. No sítio C, ocorre a interação de fosfatidilcolina ou esfingomiéline associados ao colesterol, que podem inibir a atividade catalítica da NKA (CORNELIUS *et al.*, 2015; DE LIMA SANTOS *et al.*, 2005; HABECK *et al.*, 2017)

De maneira geral, os dados apresentados nesses diversos estudos mostram que os esteroides cardiotônicos podem alterar o conteúdo dos fosfolipídios importantes para diferentes processos celulares como transdução de sinal, apoptose, formação de microdomínios. Tais estudos corroboram com os achados em nossos experimentos. No entanto, não podemos inferir como essas modificações podem afetar tais funções celulares.

Espera-se que com o aumento no número de amostras nesses experimentos, seja possível obter resultados ainda mais claros e estatisticamente significativos sobre a atuação da BD-15 no conteúdo de fosfolipídios e colesterol totais.

Iniciamos um estudo sobre a expressão da isoforma $\alpha 1$ da NKA por meio de um ensaio de western blotting. Apesar do número de experimentos ainda ser inconclusivo, é notável um aumento da expressão dessa isoforma nos grupos tratados com LPS, com ou sem a BD-15. Isso pode ser devido ao fato da dosagem de LPS ter sido capaz de induzir alterações na sinalização de mediadores da inflamação nos animais tratados já que essa isoforma tem sido cada vez mais relacionada com ativação de diversas vias de inflamação. Ela parece atuar como um transdutor de sinal e uma molécula de adesão celular, envolvendo vários componentes de vias de sinalização, como a via da tirosina quinase não-receptora associada à membrana Src, ativação da via Ras/Raf/ERK1/2, a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a via da proteína quinase B dependente de PI3K, a fosfolipase C, as oscilações de concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, e a transcrição gênica (LEITE *et al.*, 2015; LIU, X. L. *et al.*, 2007; ORELLANA *et al.*, 2016; PIERRE; XIE, 2006). Contudo, não é

possível inferir nenhuma conclusão sobre esse experimento devido ao baixo número de repetições.

7. CONCLUSÃO

Padronizamos o modelo de inflamação induzida por LPS e tratamento com BD-15 em células de linhagem de micróglia (BV-2) através das alterações na expressão da citocina pró-inflamatórias TNF- α . Os dados sugerem ainda que para avaliar de forma mais precisa as alterações nos níveis de IL-1 β o tratamento com LPS deve ser com um decurso temporal maior.

Foi possível avaliar o teor de Glutationa Reduzida (GSH) e o conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em células BV-2 e em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15, porém nos estudos *in vitro*, a variabilidade entre as repetições dos experimentos impediu uma conclusão final. Já nos estudos *in vivo*, nota-se um perfil o qual há uma diminuição no conteúdo de GSH para os tratamentos apenas com LPS, assim como um aumento na quantidade de peróxido desse mesmo grupo. Nos grupos tratados com BD-15 e LPS+BD-15 possuem um perfil de aumento de GSH e diminuição do peróxido de hidrogênio, mostrando um equilíbrio maior do sistema antioxidante.

Analisamos os níveis de colesterol e do conteúdo de fosfolipídios totais em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15, e assim como os demais ensaios, será necessário o aumento do número de repetições do experimento. Todavia, observamos uma tendência de redução no conteúdo total de fosfolipídios nos hipocampos de animais tratados com LPS e uma manutenção dos níveis nos grupos tratados com a BD-15, com e sem LPS. Como o grupo tratado apenas com LPS mostrou a tendência a diminuição, podemos inferir que neste caso a BD-15 possa ter interferido na quantidade total de fosfolipídios. Com relação aos níveis de colesterol, apesar da falta de significância estatística, é perceptível que em ambos os grupos tratados com a BD-15, com LPS ou não, obtivemos um aumento de aproximadamente 40% de colesterol na composição do extrato lipídico. Enquanto o grupo tratado apenas com LPS não possui diferença em relação ao controle. Isso sugere que assim como outros esteroides cardiotônicos, a BD-15 pode ser um potencial modulador da síntese de colesterol, devido à natureza esteroide de sua estrutura principal, e essas

mudanças nos microdomínios lipídicos podem ocasionar uma inibição da atividade catalítica da NKA.

Iniciamos, por fim, a análise da expressão das isoformas alfa 1 da NKA em hipocampo de ratos tratados com LPS e BD-15. Devido ao tempo curto para análise, foram feitos apenas dois experimentos, sendo assim não é possível inferir algo sobre a interferência dos tratamentos feitos na expressão dessa isoforma.

No presente trabalho, concluímos que embora os resultados *in vitro* não corresponderem ao padrão de reprodutibilidade e necessitem ser refeitos, os resultados apresentados *in vivo* mostram-se promissores em se tratar de elucidar mais sobre a atuação da BD-15 no estresse oxidativo e seu potencial neuroprotetor no modelo de neuroinflamação induzida por LPS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8ª ed. [S.l.]: Elsevier Saunders, 2015.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcellular Biochemistry*, v. 49, p. 241–268, 2008.
- BADSHAH, H. *et al.* Protective Effect of Lupeol Against Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation via the p38/c-Jun N-Terminal Kinase Pathway in the Adult Mouse Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 11, n. 1, p. 48–60, 2016.
- BALLATORI, N. *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, v. 390, n. 3, p. 191–214, 2009.
- BEUTLER, B.; DU, X.; POLTORAK, A. Identification of toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: Genetic and evolutionary studies. *Journal of Endotoxin Research*, v. 7, n. 4, p. 277–280, 2001.
- BIESMANS, S. *et al.* Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators of Inflammation*, v. 2013, 2013.
- BLESA, J. *et al.* Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 9, n. July, p. 1–9, 2015.
- BOCCHINI, V. *et al.* An Immortalized Cell Line Expresses Properties of Activated Microglial Cells BV-2 cells, like microglial cells, are however, distinct from peripheral macrophages by their expression of inwardly rectifying K⁺ channels in concert with a lack in outwardly r. *Journal of Neuroscience Research*, v. 31, p. 61–621, 1992.
- CAMPIA, I. *et al.* Digoxin and ouabain increase the synthesis of cholesterol in human liver cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 9, p. 1580–1594, 2009.
- CARSON, M. J.; CAMERON THRASH, J.; WALTER, B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clinical Neuroscience Research*, v. 6, n. 5, p. 237–245, 2006.
- CASADIO, M. Lipid markers of neurodegeneration. *Nature Cell Biology*, v. 24, n. 7, p. 1009, 2022.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 157, n. 1, p. 1–11, 2009.
- CEREIJIDO, M.; CONTRERAS, R. G.; SHOSHANI, L. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 4, p. 1229–1262, 2004.
- CHANG, T. Y. *et al.* Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, v. 58, n. 12, p. 2239–2254, 2017.

CHEN, A. *et al.* The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomedical Reports*, v. 1, n. 2, p. 167–176, 2013.

CHEN, W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 4, p. 3391–3396, 2016.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, v. 30, n. 2, p. 271–281, 2014.

COLAMARTINO, M. *et al.* A multi-biomarker analysis of the antioxidant efficacy of Parkinson's disease therapy. *Toxicology in Vitro*, v. 47, n. July 2017, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.020>>.

CORNELIUS, F. *et al.* General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1848, n. 9, p. 1729–1743, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.012>>.

DE LIMA SANTOS, H. *et al.* Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: Effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 41, n. 4, p. 239–248, 2005.

DE SÁ LIMA, L. *et al.* Ouabain activates NFκB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology*, v. 73, p. 327–336, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.006>>.

DE SOUZA GONÇALVES, B. *et al.* Evaluation of neuroprotective activity of digoxin and semisynthetic derivatives against partial chemical ischemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 120, n. 10, p. 17108–17122, 2019.

DE VASCONCELOS, D. I. B. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators of Inflammation*, v. 2011, 2011.

DISABATO, D.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: The Devil is in the Details Damon. *J Neurochem.*, v. 139, n. 1, p. 136–153, 2016.

ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification with path analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 25, n. 8, p. 1637–1648, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.006>>.

FANTINI, J.; YAHI, N. Brain Membranes. *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease*. [S.l.: s.n.], 2015a. p. 29–51.

FANTINI, J.; YAHI, N. *Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800111-0/00003-5>>.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.150>>.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in

neurodegenerative disease: Role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2015, 2015.

GARCIA, I. J. P. *et al.* Ouabain attenuates oxidative stress and modulates lipid composition in hippocampus of rats in lipopolysaccharide-induced hippocampal neuroinflammation in rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 120, n. 3, p. 4081–4091, 27 mar. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.27693>>.

GARCIA, I. J. P. *et al.* Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 2, p. 2156–2167, 18 fev. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.26377>>.

GARCIA, I. J. P. *et al.* Ouabain Modulates the Lipid Composition of Hippocampal Plasma Membranes from Rats with LPS-induced Neuroinflammation. *Journal of Membrane Biology*, v. 248, n. 6, p. 1191–1198, 2015.

GEERING, K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 17, n. 5, p. 526–532, 2008.

GHEORGHIADÉ, M.; HARINSTEIN, M. E.; FILIPPATOS, G. S. Digoxin for the treatment of chronic and acute heart failure syndromes. *Acute Cardiac Care*, v. 11, n. 2, p. 83–87, 2009.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. 1998.

GITLER, A. D.; DHILLON, P.; SHORTER, J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 10, n. 5, p. 499–502, 2017.

GODBOUT, J. P. *et al.* Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 10, p. 1329–1331, 2005.

GONZÁLEZ-FRAGUELA, M. E. *et al.* Glutathione depletion: Starting point of brain metabolic stress, neuroinflammation and cognitive impairment in rats. *Brain Research Bulletin*, v. 137, n. 15805, p. 120–131, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.11.015>>.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Letters*, v. 585, n. 23, p. 3798–3805, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.033>>.

GUEDES DA PAZ, E. *et al.* Doenças neurodegenerativas em adultos e idosos: um estudo epidemiológico descritivo. *Revista Neurociências*, v. 29, n. december 2010, p. 1–11, 2021.

HABECK, M. *et al.* Specific phospholipid binding to Na,K-ATPase at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 11, p. 2904–2909, 2017.

HENN, A. *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for

primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altex*. [S.l: s.n.], 2009

HENRY, C. J. *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of Neuroinflammation*, v. 5, p. 1–14, 2008.

HERTZ, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacology*, v. 55, n. 3, p. 289–309, 2008.

IP, J. P. K. *et al.* Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroinflammation*, v. 8, n. September, 2011.

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, v. 39, n. 1, p. 73–82, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>>.

JANGRA, A. *et al.* Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 337–345, 2014.

JOHNSON, W. M.; WILSON-DELFOSE, A. L.; MIEYAL, J. J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, v. 4, n. 10, p. 1399–1440, 2012.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 295, n. 4, 2008.

KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. NF- B in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 1, p. a001271_erratum-a001271_erratum, 2010.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, v. 71, n. 1, p. 511–535, 2002.

KARTHIKEYAN, S. *et al.* Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 7, p. 1366–1375, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.007>>.

KAWAMOTO, E. M. *et al.* Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-κB in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, n. 1, p. 213–228, 2012.

KINOSHITA, P. F. *et al.* Alpha 2 Na⁺,K⁺-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

KINOSHITA, P. F. *et al.* Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *Journal of Neuroinflammation*, v. 11, n. 1, 2014.

LAUWERS, E.; GOODCHILD, R.; VERSTREKEN, P. Membrane Lipids in Presynaptic Function and Disease. *Neuron*, v. 90, n. 1, p. 11–25, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.033>>.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, J. *et al.* Digoxin ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 differentiation. *International Immunopharmacology*, v. 26, n. 1, p. 103–111, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.017>>.

LEITE, J. A. *et al.* Ouabain modulates zymosan-induced peritonitis in mice. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, 2015.

LITAN, A. *et al.* A functional interaction between Na,K-ATPase β 2 - subunit/AMOG and NF2/Merlin regulates growth factor signaling in cerebellar granule cells. *Mol Neurobiol.*, v. 56, n. 5, p. 7557–7571, 2020.

LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 2, n. April, 2017.

LIU, X. L. *et al.* Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *NeuroReport*, v. 18, n. 6, p. 597–600, 2007.

LOPES, P. C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 291–293, 2016.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 30, n. 1–2, p. 42–59, fev. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.003>>Cn<<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.01.002>>Cn<[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(12\)70006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(12)70006-3)>Cn<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341287914000763>>Cn<<http://dx.doi.org/10.1016/>>.

LUND, S. *et al.* Inhibition of microglial inflammation by the MLK inhibitor CEP-1347. *Journal of Neurochemistry*, v. 92, n. 6, p. 1439–1451, 2005.

LUND, S. *et al.* The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *Journal of Neuroimmunology*, v. 180, n. 1–2, p. 71–87, 2006.

LYMAN, M. *et al.* Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>>.

MAHLEY, R. W. Central Nervous System Lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 36, n. 7, p. 1305–1315, 2016.

MAN, S. *et al.* Cardiac Glycoside Compound Isolated from *Helleborus thibetanus* Franch Displays Potent Toxicity against HeLa Cervical Carcinoma Cells through ROS-Independent Autophagy. *Chemical Research in Toxicology*, v. 32, n. 12, p. 2479–2487, 2019.

MANNA, S. K.; SREENIVASAN, Y.; SARKAR, A. Cardiac glycoside inhibits IL-8-induced biological responses by downregulating IL-8 receptors through altering

membrane fluidity. *Journal of Cellular Physiology*, v. 207, n. 1, p. 195–207, abr. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.20555>>.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MERELLI, A.; REPETTO, M.; LAZAROWSKI, A. Un cte d Au tho r P roo f Un co rre cte d Au tho r P roo f. 2020.

MIJATOVIC, T.; KISS, R. Cardiotoxic STEROIDS-MEDIATED Na⁺/K⁺-ATPase targeting could circumvent various chemoresistance pathways. *Planta Medica*, v. 79, n. 3–4, p. 189–198, 2013.

NAM, H. Y. *et al.* Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2018.

NAVA CATORCE, M.; GEVORKIAN, G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Current Neuropharmacology*, v. 14, n. 2, p. 155–164, 2016.

NEPAL, N.; ARTHUR, S.; SUNDARAM, U. Unique Regulation of Na-K-ATPase during Growth and Maturation of Intestinal Epithelial Cells. *Cells*, v. 8, n. 6, p. 593, 2019.

NESHER, M. *et al.* The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. *Life Sciences*, v. 80, n. 23, p. 2093–2107, 2007.

NICHOLS, E. *et al.* Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, v. 7, n. 2, p. e105–e125, 2022.

OKORJI, U. P. *et al.* Antimalarial Drug Artemether Inhibits Neuroinflammation in BV2 Microglia Through Nrf2-Dependent Mechanisms. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 9, p. 6426–6443, 2016.

ORELLANA, A. M. *et al.* Cardiotoxic steroids as modulators of neuroinflammation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.

ORELLANA, A. M. *et al.* Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory. *Neuropharmacology*, v. 140, p. 260–274, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.008>>.

OSELKIN, M.; TIAN, D.; BERGOLD, P. J. Low-dose cardiotoxic steroids increase sodium-potassium ATPase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia. *Neuroscience Letters*, v. 473, n. 2, p. 67–71, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.021>>.

PACZULA, A.; WIECEK, A.; PIECHA, G. Cardiotoxic Steroids—A Possible Link Between High-Salt Diet and Organ Damage. *International Journal of Molecular*

Sciences Review, v. 22, n. 4, p. 511–535, 2019.

PADILLA-BENAVIDES, T. *et al.* Trehalose Is a Key Determinant of the Quiescent Metabolic State That Fuels Cell Cycle Progression upon Return to Growth. *Molecular biology of the cell*, v. 21, n. 24, p. 4325–4337, 2010.

PARK, S. M. *et al.* Ginsenoside Rg3 attenuates microglia activation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, n. 9, p. 1546–1552, 2012.

PATOCKA, J. *et al.* Digoxin: Pharmacology and toxicology—A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 79, n. May, p. 1–6, 2020.

PAVLOV, V. A.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. *Annual Review of Immunology*, v. 36, p. 783–812, 2018.

PESSÔA, MARCO T.C. *et al.* Selectivity analyses of γ -benzylidene digoxin derivatives to different Na,K-ATPase α isoforms: a molecular docking approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 33, n. 1, p. 85–97, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1380637>>.

PESSÔA, MARCO TÚLIO C. *et al.* 21-Benzylidene digoxin decreases proliferation by inhibiting the EGFR/ERK signaling pathway and induces apoptosis in HeLa cells. *Steroids*, v. 155, p. 108551, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108551>>.

PIERRE, S.; XIE, Z. The Na, K-ATPase receptor complex. *Cell biochemistry and biophysics*, v. 46, n. 3, p. 303–315, 2006.

PLÓCIENNIKOWSKA, A. *et al.* Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 3, p. 557–581, 2015.

RADI, E. *et al.* Apoptosis and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. v. 42, 2014.

ROCHA, S. C. *et al.* 21-benzylidene digoxin: A proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2014a.

ROCHA, S. C. *et al.* 21-Benzylidene Digoxin: A Proapoptotic Cardenolide of Cancer Cells That Up-Regulates Na,K-ATPase and Epithelial Tight Junctions. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e108776, 7 out. 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.017>>.

SAADE, M. Efeitos da proteína GPNMB na modulação de processos inflamatórios causados pelo LPS em células da microglia e astrócitos de ratos. 2021.

SAADE, M. *et al.* The Role of GPNMB in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. May, p. 1–10, 2021.

SALEPPICO, S. *et al.* Iron regulates microglial cell-mediated secretory and

- effector functions. *Cellular Immunology*, v. 170, n. 2, p. 251–259, 1996.
- SASTRY, P. S. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Progress in Lipid Research*, v. 24, n. 2, p. 69–176, 1985.
- SAYEED, I. *et al.* Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Annals of Emergency Medicine*, v. 47, n. 4, p. 381–389, 2006.
- SCHAIN, M.; KREISL, W. C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders—a Review. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 17, n. 3, 2017.
- SCHNAAR, R. L.; GERARDY-SCHAHN, R.; HILDEBRANDT, H. Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 2, p. 461–518, 2014.
- SHABAB, T. *et al.* Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.
- SILVA, L. N. D. *et al.* Differences of lipid membrane modulation and oxidative stress by digoxin and 21-benzylidene digoxin. *Experimental Cell Research*, v. 359, n. 1, p. 291–298, out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.017>>.
- SIMI, A. *et al.* Mechanisms of regulation for interleukin-1 β in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, v. 52, n. 8, p. 1563–1569, 2007.
- SPULBER, S. *et al.* Molecular hydrogen reduces Ips-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, 2012.
- SULAKHIYA, K. *et al.* Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 744, p. 124–131, 2015.
- SUTTERWALA, F. S.; HAASKEN, S.; CASSEL, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1319, n. 1, p. 82–95, 2014.
- SUZUKI, M. *et al.* Mitotic neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 9, p. 3202–3207, 2004.
- TANCHEVA, L. P. *et al.* Neuroprotective mechanisms of three natural antioxidants on a rat model of parkinson's disease: A comparative study. *Antioxidants*, v. 9, n. 1, 2020.
- TANIGUTI, E. H. *et al.* Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Physiology and Behavior*, v. 188, n. February, p. 270–275, 2018.

TELEANU, D. M. *et al.* An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 11, 2022.

TIWARI, V. *et al.* Redefining the role of peripheral LPS as a neuroinflammatory agent and evaluating the role of hydrogen sulphide through metformin intervention. *Inflammopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 253–264, 2016.

VALADARES, J. M. DE M. *et al.* Cytotoxic effect of carbohydrate derivatives of digitoxigenin involves modulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 122, n. 12, p. 1903–1914, 2021.

WANG, J. M. *et al.* The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 19, p. 4706–4718, 2005.

WANG, T. *et al.* Effects of digoxin on cell cycle, apoptosis and NF- κ B pathway in Burkitt's lymphoma cells and animal model. *Leukemia and Lymphoma*, v. 58, n. 7, p. 1673–1685, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2016.1256480>>.

WANG, Y. *et al.* Digoxin exerts anticancer activity on human nonsmall cell lung cancer cells by blocking PI3K/Akt pathway. *Bioscience Reports*, v. 41, n. 10, p. 1–13, 2021.

WEN, L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of bufalin in rodents. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, 2014.

WON, S. J. *et al.* Assessment at the single-cell level identifies neuronal glutathione depletion as both a cause and effect of ischemia-reperfusion oxidative stress. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 18, p. 7143–7152, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Parkinson Disease: A public health approach*. [S.l.: s.n.], 2022. v. 291.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 10, p. 2434–2439, 2002.

YONEDA, J. S. *et al.* Na,K-ATPase reconstituted in ternary liposome: The presence of cholesterol affects protein activity and thermal stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 564, p. 136–141, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.09.015>>.

ZEEVALK, G. D.; RAZMPOUR, R.; BERNARD, L. P. Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 62, n. 4, p. 236–249, 2008.

ZHANG, J. *et al.* Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Molecular Immunology*, v. 116, n. August, p. 29–37, 2019.

ZIFF, O. J.; KOTECHA, D. Digoxin: The good and the bad. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 26, n. 7, p. 585–595, 2016.