



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha,
Santo André/SP, CEP 09210-580 Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-
7617 iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica
submetido para avaliação no
Edital: 04/2022

Título do projeto: Efeito da aplicação de TAK242 no desenvolvimento somático e sensório-motor de camundongos neonatos submetidos à ativação imune materna e anóxia neonatal.

Palavras-chave do projeto: Anóxia neonatal; ativação imune materna; TAK242; neurodesenvolvimento.

Área do conhecimento do projeto: Neurociência .

Sumário

1. Resumo	2
2. Introdução e Justificativa	3-5
3. Objetivos	6
4. Metodologia	6-8
5. Cronograma de atividades.....	8-9

1. Resumo

A anóxia neonatal é uma das principais causas de morte em neonatos. A anóxia neonatal é caracterizada pela falta de oxigênio antes, durante ou após o nascimento do bebê. A prematuridade é um fator de risco para a ocorrência desse evento, uma vez que o neonato apresenta imaturidade do aparelho respiratório. Com os avanços tecnológicos nas últimas décadas, grupos de pesquisa têm estudado como adversidades ocasionadas no período de neurodesenvolvimento afetam as funções cerebrais. Adicionalmente, foi descoberto que a privação de oxigênio desencadeia cascatas bioquímicas que levam a morte celular em diversas estruturas do encéfalo, como o hipocampo e córtex. Nos casos em que os neonatos sobrevivem, esses indivíduos acabam por desenvolver déficits cognitivos e motores, além de que alguns casos de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) parecem estar associados ao evento de privação de oxigênio. Infelizmente, ainda não está totalmente elucidado como a falta de oxigenação no período de neurodesenvolvimento interfere na função cerebral. Curiosamente, estudos mostram que inflamações gestacionais com consequente ativação imune materna (AIM) podem modular negativamente o sistema imunológico fetal. Assim, sugere-se que a combinação desses dois insultos – AIM e privação de oxigênio – podem prejudicar o desenvolvimento cerebral da prole. Atualmente, o único tratamento destinado a bebês que sofrem a privação de oxigênio é a hipotermia, todavia, o mesmo é realizado apenas nascidos a termo. Sendo assim, o objetivo desse projeto é avaliar os efeitos da injeção de TAK242 sobre o desenvolvimento somático e sensório-motor em animais que foram expostos ao modelo de “double hit” – AIM e a anóxia neonatal -, visando explorar uma

nova alternativa terapêutica que possa ser aplicada em uma idade correlata a prematuridade.

2. Introdução e Justificativa

Clinicamente conhecida como anóxia neonatal, a privação de oxigênio ao nascimento é uma das principais causas de morte e, também, um fator de risco importante associado ao desenvolvimento de distúrbios do neurodesenvolvimento em neonatos do mundo todo (Saraceno, Caceres et al. 2016, Hisle-Gorman, Susi et al. 2018).

Os transtornos do neurodesenvolvimento são um grupo de patologias oriundas de alterações no período de desenvolvimento do encéfalo que acarretam em déficits cognitivos, comportamentais e psicomotores nos indivíduos (Niemi, Martin et al. 2018). A relação entre a ocorrência da anóxia neonatal e os distúrbios do desenvolvimento neural não está bem estabelecida, mas sabe-se que a fisiopatologia da lesão pela privação de oxigênio desencadeia cascatas bioquímicas complexas que ocorrem simultaneamente, dificultando seu completo entendimento (Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. 2006). É importante destacar que a lesão cerebral causada pela privação de oxigênio tem como resultante mais grave a encefalopatia hipóxico-isquêmica, a qual se desenvolve em um processo contínuo que envolve algumas etapas que desencadeiam uma cascata de eventos ligados ao desenvolvimento das sequelas e ao grau de severidade as mesmas (Cho, K. H., et al. (2020)). Sendo assim, logo com a diminuição da oxigenação inicia-se a fase primária, em que, a falha energética está relacionada ao decréscimo da síntese de adenosina trifosfato (ATP), causando o desequilíbrio da membrana celular e invertendo as concentrações iônicas, de forma a gerar o edema celular (Korc, I., et al. (1995), Prandini, M. N., et al. (2005)). Dada a queda da síntese de ATP, o funcionamento das bombas iônicas, como a $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$, são prejudicadas levando ao acúmulo intracelular de Na^+ , por exemplo, responsável pelo aumento da despolarização e consequente liberação excessiva de neurotransmissores, especialmente do glutamato, de caráter excitatório (du Plessis, A. J. et al.(1997), Sanches, E. F., et al. (2013). Portanto, os neurônios pós-sinápticos responsivos a esse neurotransmissor

são ativados devido a maior interação com receptores ionotrópicos, o que permite a entrada de níveis significativos de cálcio tornando esse evento altamente neurotóxico (Delivoria-Papadopoulos, M. and O. P. Mishra (1998)) em conjunto ao acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica por falha na recaptação astrocitária (Davidson, J. O., et al. (2015)).

No entanto, mesmo com a morte neuronal primária durante um período suficientemente prolongado de privação de oxigênio, uma grande parte dos neurônios têm a capacidade de recuperar parcialmente seus processos metabólicos, em um período denominado fase latente, a qual se estende ao longo das primeiras 6 horas posterior a lesão (Cho, K. H., et al. (2020)).

Seguida a fase latente, há a ocorrência da fase secundária precedida da reperfusão tecidual que traz consigo células imunes como linfócitos T, B e NK, mastócitos, células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares, as quais secretam citocinas pró-inflamatórias gerando a persistência da resposta inflamatória iniciada pela micróglia residente e astrócitos, resultando em neuroinflamação e neurodegeneração com morte celular massiva (Albertsson, A. M., et al. (2014), Rocha-Ferreira, E. and M. Hristova (2015), Hedtjarn, M., et al. (2004), Zhang, P., et al. (2014)).

Ainda, seguida da fase secundária, há uma fase terciária relacionada ao reparo celular e reorganização dos circuitos neuronais, de forma que a proliferação de novas células e o remodelamento dos circuitos neuronais são estimulados. No entanto, existem evidências de que a apoptose fisiológica pode ser regulada positivamente em algumas regiões encefálicas, prejudicando a futura maturação e sobrevivência de novas células (Cho, K. H., et al. (2020), Marin-Padilla, M. (1997)). Contudo, os mecanismos precisos que influenciam na cronicidade da lesão neuronal não são completamente elucidados, embora seja sugerido que há o envolvimento de alterações epigenéticas e inflamação crônica (Davidson, J. O., et al. (2015)).

A neuroinflamação é caracterizada pelo aumento da atividade de proliferação de células gliais como astrócitos e microglia. Ambas as células, podem adquirir fenótipos reativos quando estão na presença de algum evento inflamatório, como a

AIM por exemplo. Quando as células da glia são apresentadas a um estímulo nocivo, elas liberam citocinas e quimiocinas para conduzir a resposta imune e, assim, regular o ambiente. Em meio a estimulantes inflamatórios, a microglia se torna reativa, ou seja, ela se torna menor e mais ramificada, com o soma celular aumentado ganhando uma forma ameboide. A microglia ameboide libera citocinas como IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , quimiocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS), que desencadeiam a reatividade dos astrócitos. Os astrócitos também sofrem alteração morfológica durante a resposta imune, eles estendem seus processos e se tornam hipertrofiados, respondendo com a produção e secreção de citocinas como IL-17, IL-1 β , TNF- α e IL-6 que contribuem para a modulação da inflamação ((Kierdorf, K. and M. Prinz (2013), Lenz, K. M. and L. H. Nelson (2018)).

Além disso, como parte da imunidade inata, a microglia possui o receptor Toll-Like 4 (TLR4) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMP), em específico o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular bacteriana (Akira, S., & Takeda, K. (2004)). Assim, frente a interação de ambos – TLR4 e LPS – uma via de sinalização intracelular é desencadeada culminando na produção de citocinas de caráter pró-inflamatório como TNF α , IL1b e iNOS (Gárate, I., et al. (2014)). O TAK242, também denominado resatorvid, é um inibidor seletivo e específico da sinalização do receptor Toll-Like 4 (TLR4) (Ono, Y., et al. (2020)). Dessa forma, ao se ligar ao seu correspondente, o TAK242 ocasiona uma interferência nas interações entre o TLR4 e suas moléculas adaptadoras, consequentemente atenuando a produção de produtos inflamatórios pela microglia e outras células de defesa, como macrófagos, sugerindo ter um efeito protetor que se relaciona à diminuição da circulação de citocinas importantes que podem fomentar a resposta pró-inflamatória (Takashima, K., et al. (2009), Takeda, K., & Akira, S. (2004)).

Sendo assim, pensando no mecanismo de ação do TAK242 e seu efeito na supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias, o presente projeto visa explorar a aplicação dessa molécula como alternativa terapêutica para a lesão cerebral subsequente à AIM e anóxia neonatal, uma vez que ambos os insultos tem alta relevância no âmbito da saúde pública por originar deficiências severas nos neonatos prematuros que sobrevivem, além de impactar na qualidade de vida dos mesmos.

3. Objetivo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o desenvolvimento somático e sensório-motor em camundongos neonatos C57/BL6 utilizando uma bateria de testes específicos e medidas corpóreas durante 17 dias após os animais terem sido expostos à AIM e anóxia neonatal.

4. Metodologia

4.1 Animais

Serão utilizados filhotes de casais de camundongos (C57/BL6), criados no biotério da Universidade Federal do ABC - câmpus São Bernardo do Campo, com temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12h, início do claro às 7:00h, e água e comida ad libitum. As fêmeas em idade de reprodução serão monitoradas quanto ao seu ciclo estral através do lavado vaginal, quando em pró-estro as fêmeas serão alocadas na caixa de seus respectivos machos para o acasalamento durante uma noite. O sucesso da cópula será considerado com a presença do plug vaginal e ganho de peso. No mais, o dia seguinte, posterior ao acasalamento será considerado o dia de gestação zero (DG0).

4.2 Ativação imune materna

O protocolo escolhido já está bem estabelecido na literatura (Xiao et al, 2021). Para a indução da inflamação perinatal, será realizada a injeção de LPS (E. coli 0111:B4, Sigma-Aldrich, Cat#L4391) em fêmeas adultas grávidas. A aplicação de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LPS em 1.0 mL de PBS ou PBS puro (veículo) será realizada no décimo quarto dia e meio de gestação (DG14.5). Após o nascimento dos filhotes, estes serão separados em três grupos: aqueles que a mãe receberá LPS, serão submetidos à privação de oxigênio e receberão o tratamento com TAK242 (LAT); aqueles que a mãe receberá LPS, serão submetidos à anóxia e irão receber o tratamento com o veículo (LCV); e os filhotes que as mães receberão a solução veículo e posteriormente serão expostos à normóxia e receberão o veículo do TAK242 (VCV).

4.3 Anóxia neonatal

Para anóxia neonatal, será empregado o sistema descrito por Takada e colaboradores com poucas modificações. Em camundongos C57/BL6 o modelo foi recentemente padronizado. Resumidamente, os camundongos neonatos com 4 dias de vida, pesando entre 1,8 e 2,5 g, serão colocados em uma câmara de policarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 10 L/minuto, durante 12 minutos e aquecidos a 37°C. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente. Em seguida à recuperação dos animais, a qual pode ser observada através do restabelecimento da coloração rosada, da respiração e da movimentação ativa, os mesmos receberão o tratamento com TAK242 ou solução veículo e serão devolvidos para a mãe até que seja feita a bateria de testes comportamentais.

4.4 Tratamento com TAK242

O TAK-242 será dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em solução salina até uma concentração final de 1.0% de DMSO. Logo após a anóxia neonatal, 3mg/kg da molécula de TAK242 ou solução salina contendo DMSO 1.0 será administrado por via intraperitoneal uma vez ao dia durante 7 dias conforme o protocolo descrito em literatura (Liang et al., 2019).

4.5 Análise do desenvolvimento somático e sensório-motor

Será avaliado se a injeção do TAK242 tem efeitos positivos no desenvolvimento somatossensorial de animais que expostos ao “double hit” entre a idade de P5 (5º pós-natal) e P21, sendo esses: Recuperação de Decúbito: o animal em posição supina, deve se virar em 5 segundos, sendo positivo quando o corpo todo estiver virado; Reação de Aceleração: o animal em decúbito dorsal, a 30 cm de distância do solo (adaptado com algodão para amortecer a queda), é liberado em queda livre, tendo de cair com as quatro patas voltadas para baixo; Pressão palmar (PP): o animal deve apresentar resposta ao ser colocada uma haste (adaptado com um “clips”) em contato com a palma da pata anterior; Vibrissas: o animal é suspenso pela cauda, e suas vibrissas ficam em contato com a mesa de apoio, tendo 5 segundos para apoiar as patas dianteiras na mesa, tentando caminhar; Reação de Susto: acompanhamento

diário para ver quando os animais responderão ao estímulo do susto, que será o toque de um ruído agudo a aproximadamente 10cm de distância; Geotaxia negativa (GN): os filhotes serão colocados em uma rampa com inclinação aproximada de 45° com a cabeça direcionada para baixo e será observado se os animais conseguirão, em 5 segundos, redirecionar seu corpo de modo a subir a rampa. Aversão ao precipício (AP): O animal é colocado com as patas dianteiras na ponta de uma mesa (precipício) e deve se virar para a área segura, em uma curvatura de 45°, em 5 segundos. Além disso será observado o dia em que ocorrer a abertura do conduto auditivo (ACA), o desdobramento do pavilhão auricular (DPA), a erupção dos incisivos inferiores (EII) e superiores (EIS), e abertura dos olhos (AO).

Também serão realizadas medidas corporais quanto ao eixo ântero-posterior: medição da distância do osso occipital à ponta do nariz do animal; Medida látero-lateral: medição da distância interauricular; Medida do corpo (eixo longitudinal): medida da distância entre a ponta do nariz e o início da cauda.; Peso corpóreo: aferição do peso diário em balança digital calibrada.

4.6 Análise Estatística

Os resultados dos grupos serão analisados com two-way ANOVA pelo software GraphPad Prism 6.

5. Cronograma de atividades

Etapas:

- I. Obtenção de ninhadas através do acasalamento controlado dos animais, sendo que a mãe receberá LPS ou PBS no DG14.5; e após o nascimento os filhotes serão expostos ao segundo hit – anóxia neonatal – e posteriormente ao tratamento com TAK242 ou veículo.
- II. Início da bateria de testes para análise do desenvolvimento somático e sensório-motor.
- III. Elaboração do relatório parcial.
- IV. Análise estatísticas dos dados obtidos.
- V. Elaboração e entrega do relatório final.

Atividades	1º Bim.	2º Bim.	3º Bim.	4º Bim.	5º Bim.	6º Bim.
I. Obtenção de ninhadas	x	x	x	x		
II. Realização dos testes			x	x		
III. Relatório Parcial			x	x		
IV. Avaliação dos dados				x	x	
V. Relatório final						x

Referências

Saraceno, G. E., L. G. Caceres, L. R. Guelman, R. Castilla, L. D. Udovin, M. H. Ellisman, M. A. Brocco and F. Capani (2016). "Consequences of excessive plasticity in the hippocampus induced by perinatal asphyxia." Exp Neurol **286**: 116-123.

Kierdorf, K. and M. Prinz (2013). "Factors regulating microglia activation." *Front Cell Neurosci* 7: 44.

Lenz, K. M. and L. H. Nelson (2018). "Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function." *Front Immunol* 9: 698.

Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2010). TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules. *Molecular Pharmacology*, 79(1), 34–41.

Takada, S. H., C. A. Sampaio, W. Allemandi, P. H. Ito, L. F. Takase and M. I. Nogueira (2011). "A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity." *J Neurosci Methods* 198(1): 62-69.

Liang, M., Zhong, H., Rong, J., Li, Y., Zhu, C., Zhou, L., & Zhou, R. (2019). Postnatal lipopolysaccharide exposure impairs adult neurogenesis and causes depression-like behaviors through astrocytes activation triggering GABAA receptor downregulation. *Neuroscience*.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801.

Colonna, M. and O. Butovsky (2017). "Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration." *Annual Review of Immunology* 35(1): 441-468.

Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." *Trends Neurosci* 19(8): 312-318.

Lenz, K. M. and L. H. Nelson (2018). "Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function." *Front Immunol* 9: 698.

Rock, R. B., et al. (2004). "Role of microglia in central nervous system infections." *Clin Microbiol Rev* 17(4): 942-964, table of contents

Pekny, M., et al. (2014). "The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis." *Neurosci Lett* 565: 30-38.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* 119(1): 7-35.

Atladdottir, H. O., et al. (2010). "Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders." *J Autism Dev Disord* 40(12): 1423-1430.

Cho, K. H., et al. (2020). "Cooling and immunomodulation for treating hypoxic-ischemic brain injury." *Pediatr Int* 62(7): 770-778.

Korc, I., Bidegain, M. and M. Martell (1995). "Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. " Rev. Médica del Uruguay 11: 121–135.

Prandini, M. N., et al. (2005). "Mild hypothermia reduces polymorphonuclear leukocytes infiltration in induced brain inflammation." Arq Neuropsiquiatr 63(3B): 779-784.

du Plessis, A. J. and M. V. Johnston (1997). "Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection." Clin Perinatol24(3): 627-654.

Sanches, E. F., et al. (2013). "Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage." Neuroscience237: 208-215.

Delivoria-Papadopoulos, M. and O. P. Mishra (1998). "Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention." J Pediatr 132(3 Pt 2): S30-34.

Davidson, J. O., et al. (2015). "Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here?" Front Neurol 6: 198.

Marin-Padilla, M. (1997). "Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. II: white matter lesions of the neocortex." J Neuropathol Exp Neurol56(3): 219-235.

Albertsson, A. M., D. Bi, L. Duan, X. Zhang, J. W. Leavenworth, L. Qiao, C. Zhu, S. Cardell, H. Cantor, H. Hagberg, C. Mallard and X. Wang (2014). "The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury." J Neuroinflammation11: 153.

Rocha-Ferreira, E. and M. Hristova (2015). "Antimicrobial peptides and complement in neonatal hypoxia-ischemia induced brain damage." *Front Immunol* 6: 56.

Hedtjarn, M., C. Mallard, S. Eklind, K. Gustafson-Brywe and H. Hagberg (2004). "Global gene expression in the immature brain after hypoxia-ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 24(12): 1317-1332.

Zhang, P., G. Cheng, L. Chen, W. Zhou and J. Sun (2014). "Cerebral hypoxia-ischemia increases toll-like receptor 2 and 4 expression in the hippocampus of neonatal rats." *Brain Dev.*

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499–511.

Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J. L., Caso, J. R., Alou, L., Gómez-Lus, M., & Leza, J. (2014). Toll-like 4 receptor inhibitor TAK-242 decreases neuroinflammation in rat brain frontal cortex after stress. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 8.

Ono, Y., Maejima, Y., Saito, M., Sakamoto, K., Horita, S., Shimomura, K., ... Kotani, J. (2020). TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice. *Scientific Reports*, 10(1).

Takashima, K., Matsunaga, N., Yoshimatsu, M., Hazeki, K., Kaisho, T., Uekata, M., ... Ii, M. (2009). Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1250–1262.

Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9.