

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Curso de Biotecnologia – Ênfase em Biotecnologia Molecular

Daniel Oppermann Peixoto

Efeitos da administração intranasal de FPS-ZM1 na neuroinflamação e na interação com o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada em modelo animal de inflamação sistêmica

Porto Alegre

2021

Daniel Oppermann Peixoto

Efeitos da administração intranasal de FPS-ZM1 na neuroinflamação e na interação com o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada em modelo animal de inflamação sistêmica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia – Ênfase em Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientador: Prof. Dr. Juciano Gasparotto

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Peixoto, Daniel Oppermann

Efeitos da administração intranasal de FPS-ZM1 na neuroinflamação e na interação com o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada em modelo animal de inflamação sistêmica / Daniel Oppermann Peixoto. -- 2021.

46 f.

Orientador: Daniel Pens Gelain.

Coorientador: Juciano Gasparotto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Bioquímica. 2. RAGE. 3. LPS. 4. FPS-ZM1. 5. Neuroinflamação. I. Gelain, Daniel Pens, orient. II. Gasparotto, Juciano, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Daniel Oppermann Peixoto

Efeitos da administração intranasal de FPS-ZM1 na neuroinflamação e na interação com o Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada em modelo animal de inflamação sistêmica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biotecnologia – Ênfase em Biotecnologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientador: Prof. Dr. Juciano Gasparotto

Aprovado em: Porto Alegre, 19 de maio de 2021

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Bioquímica

Prof. Dra. Jade de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Bioquímica

MSc. Nauana Somensi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Bioquímica

RESUMO

A neuroinflamação está presente em grande parte das doenças neurodegenerativas, muitas vezes atuando no desenvolvimento e na progressão destas. O Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE) é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas, capaz de modular a inflamação através da interação com seus ligantes, responsáveis por induzir a ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias. Assim, elevados níveis de RAGE e de seus ligantes, como a CML, a HMGB1, a HSP70 e a S100B, acabam participando na manutenção e na propagação de quadros inflamatórios. Considerando o papel deste receptor na instauração e na sustentação da neuroinflamação, este trabalho descreve os efeitos da inibição do RAGE através do tratamento intranasal com seu antagonista FPS-ZM1, em um modelo animal de neuroinflamação crônica induzida por uma injeção intraperitoneal aguda de lipopolissacarídeo (LPS). 70 dias após a administração de LPS (2 mg/kg, i.p.), os ratos utilizados no estudo receberam intranasalmente, ao longo de 14 dias, 1,2 mg de FPS-ZM1. Nos dias 88 e 89, os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto, sendo eutanasiados no dia 90 após a injeção i.p. do composto. Amostras de soro e de líquido cefalorraquidiano (CSF) foram coletadas: (i) para análise dos níveis de RAGE e de seus ligantes e (ii) para a investigação de perfis inflamatórios e oxidativos. De todos os analitos investigados, 90 dias após sua administração, o LPS provoca uma diminuição apenas dos níveis de corticosterona, e um aumento somente dos níveis de S100B, no soro e no CSF, respectivamente. O tratamento intranasal com FPS-ZM1 resgata o comportamento do tipo-depressivo/ansioso e os elevados níveis de S100B no CSF induzidos pela injeção de LPS, falhando em reverter a diminuição dos níveis de corticosterona no soro provocada pelo modelo. Este trabalho mostra que a inibição de RAGE, através do tratamento intranasal com seu inibidor farmacológico, FPS-ZM1, resgata características relacionadas à neuroinflamação; porém, não altera parâmetros relativos a quadros inflamatórios sistêmicos, sugerindo que o RAGE, a nível de SNC, possa estar associado ao desenvolvimento de estados neuroinflamatórios induzidos por condições de inflamação sistêmica.

Palavras-chave: RAGE, FPS-ZM1, Neuroinflamação

ABSTRACT

Neuroinflammation is a condition present in most neurodegenerative diseases, and it many times acts in both their development and progression. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) is a protein of the immunoglobulin superfamily, capable of regulating inflammation through interaction with its ligands, which are responsible for inducing the activation of intracellular pro-inflammatory signaling cascades. Thus, high levels of RAGE and its ligands, such as CML, HMGB1, HSP70 and S100B, end up being accountable for the unfolding and maintenance of inflammatory conditions. Considering the role of this receptor in the establishment and upkeep of neuroinflammation, this study describes the effects of RAGE inhibition through an intranasal treatment with its antagonist FPS-ZM1, in an animal model of chronic neuroinflammation induced by an acute intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). 70 days after LPS administration (2 mg / kg, i.p.), the rats used in the study received intranasally, over 14 days, 1.2 mg of FPS-ZM1. On days 88 and 89, the animals were submitted to the Open Field Test, being euthanized on day 90 after intraperitoneal injection of the compound. Serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected: (i) for the analysis of RAGE and their ligands levels, and (ii) for the study of the inflammatory and the oxidative status. Of all the analytes investigated, 90 days after its administration, LPS led to a decrease only in the levels of corticosterone, and an increase only in the levels of S100B, in serum and CSF, respectively. Intranasal treatment with FPS-ZM1 rescued the depressive/anxious-like behavior and the high levels of S100B in the CSF induced by the injection of LPS, failing to reverse the decrease in serum corticosterone, promoted by the model. This work demonstrates that the inhibition of RAGE, through an intranasal treatment with its pharmacological inhibitor, FPS-ZM1, rescues aspects related to neuroinflammation, but fails to modulate systemic inflammatory markers, suggesting that RAGE, in the CNS, may be associated with the development of a systemic inflammation-induced neuroinflammatory condition.

Keywords: RAGE, FPS-ZM1, Neuroinflammation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DESENHO EXPERIMENTAL.	17
FIGURA 2: PESAGENS.	23
FIGURA 3: TESTE DE CAMPO ABERTO.	25
FIGURA 4: PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO – SORO.	27
FIGURA 5: REGRESSÃO LINEAR – TEMPO V. NÍVEIS RELATIVOS DE CORT SÉRICO.	28
FIGURA 6: RAGE E SEUS LIGANTES – SORO.	29
FIGURA 7: PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO – CSF.	31
FIGURA 8: REGRESSÃO LINEAR – TEMPO V. NÍVEIS RELATIVOS DE CORT DO CSF.	32
FIGURA 9: RAGE E SEUS LIGANTES – CSF.	33
FIGURA 10: REGRESSÕES LINEARES – OFT V. CORT/S100B.	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: QUANTIDADE DE FPS-ZM1 ADMINISTRADA EM CADA DIA DE TRATAMENTO	18
TABELA 2: DILUIÇÕES DE ANTICORPOS PARA ELISA INDIRETO.....	21
TABELA 3: VALORES DE <i>P</i> DAS ANOVAS ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS, NOS DIFERENTES DIAS DO OFT.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE: 4-Hidroxinonenal

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada (*Advanced Glycation Endproducts*)

BBB: Barreira Hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*)

BSA: Albumina de Soro Bovino

CML: N(6)-Carboximetilissina

CORT: Corticosterona

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

CSF: Líquido Cefalorraquidiano

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GRs: Receptores de Glicocorticoides

HMGB1: *High mobility group box 1 protein*

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (*Hypothalamus-Pituitary-Adrenal*)

HSP70: *Heat-shock protein 70*

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

i.n.: Intranasal

i.p.: Intraperitoneal

LPS: Lipopolissacarídeo

NF- κ B: Fator Nuclear *kappa* B

OD: Densidade Ótica

OFT: Teste de Campo Aberto (*Open Field Test*)

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PFA: Paraformaldeído

RAGE: Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada

S100B: *S100 calcium-binding protein B*

SNC: Sistema Nervoso Central

TMB: *Tetramethylbenzidine*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Reagentes	16
3.2 Declaração Ética	16
3.3 Animais	16
3.4 Desenho Experimental	17
3.5 Preparo e administração intraperitoneal de LPS	18
3.6 Preparo e administração intranasal de FPS-ZM1	18
3.7 Teste de Campo Aberto	19
3.8 Eutanásia e Coleta de Soro e de Líquido Cefalorraquidiano	19
3.9 Dosagem de proteínas	20
3.10 Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA Indireto)	20
3.11 Análises Estatísticas	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Tratamento intranasal com FPS-ZM1 não reverte diminuição de ganho de peso induzida por administração sistêmica aguda de LPS	22
4.2 FPS-ZM1 intranasal reverte déficits locomotores e cognitivos-comportamentais induzidos por administração sistêmica aguda de LPS	24
4.3 Redução dos níveis de corticosterona no soro, induzida por administração sistêmica aguda de LPS, não é revertida por tratamento intranasal com FPS-ZM1	26
4.4 Redução dos níveis de S100B no CSF em animais injetados intraperitonealmente com LPS é revertida com tratamento intranasal de FPS-ZM1	30
4.5 Níveis alterados de corticosterona no soro, mas não de S100B no CSF, se relacionam com parâmetros cognitivos-comportamentais	34
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas, por mais heterogêneas que sejam, possuem em comum a perda progressiva da função de neurônios. Tanto a morte neuronal como a presença de outros distúrbios homeostáticos são capazes de levar a tal fenômeno. O fardo carregado por indivíduos portadores de tais doenças se estende para seus próximos, como para seus familiares e cuidadores, gerando fortes impactos, tanto emocionais como econômicos. Somente nos Estados Unidos, é esperado que até 2050 os gastos anuais associados ao tratamento de pacientes com Doença de Alzheimer atinjam a marca de \$1 trilhão de dólares (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015). Fatores genéticos e ambientais, tais como a neuroinflamação e o próprio envelhecimento, se relacionam fortemente com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CUNNINGHAM, 2013; OLSSON et al., 2005; RANSOHOFF, 2016), tornando-os almejados alvos para investigação.

A neuroinflamação é uma condição presente na grande maioria das doenças do sistema nervoso central (SNC), sendo caracterizada principalmente pela ativação do sistema neuroimune. Este sistema, composto essencialmente por células da micróglia e da astróglia, quando ativo, é responsável por produzir uma enorme gama de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e mensageiros secundários (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; SHABAB et al., 2017). Quando instaurada, a neuroinflamação é capaz de modular a complexa relação entre enzimas, receptores e fatores de transcrição, muitas vezes afetando a homeostase neuronal, podendo levar, cronicamente, à perda de plasticidade e à neurodegeneração, culminando, ultimamente, em distúrbios cognitivos e comportamentais (VON BERNHARDI et al., 2015).

No desenvolvimento da neuroinflamação, o líquido cefalorraquidiano (CSF) exerce um importante papel. Este fluido, cuja principal função é proteger o SNC de danos mecânicos e imunológicos, banha múltiplos tecidos nervosos, e assim como a barreira hematoencefálica (BBB), está implicado no transporte de moléculas entre a circulação sanguínea e o parênquima cerebral (GHERSI-EGEA et al., 2018). Em doenças neuroinflamatórias – e em outras condições estressantes –, os níveis de diversos mediadores inflamatórios são encontrados alterados no CSF, correlacionando-se positivamente com outros indicadores de neuroinflamação (E et al., 2017; LEPENNETIER et al., 2019; LIU et al., 2020a; MILLER et al., 2019). Desta forma, a análise do CSF permite investigar, ainda que parcialmente, o panorama neuroinflamatório geral do SNC.

A inflamação sistêmica atua vigorosamente na instalação de um perfil neuroinflamatório. Através de estudos em modelos animais, foi visto que, quando ativadas, as células imunes periféricas produzem múltiplos mediadores capazes de se comunicar com o SNC – como a Interleucina-1 β (IL-1 β), a Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) –, resultando na ativação de astrócitos e células microgliais (CUNNINGHAM, 2013; PERRY, 2004). Deste modo, modelos animais de inflamação sistêmica acabam sendo amplamente utilizados para estudar condições neuroinflamatórias e/ou neurodegenerativas (HOOGLAND et al., 2015).

A inflamação é uma resposta necessária e vital para a sobrevivência de um organismo frente a insultos imunológicos. Porém, quando não regulada, as consequências de sua cronicidade podem passar a ser prejudiciais, como mencionado anteriormente. Os mecanismos de controle da inflamação se estendem desde respostas locais (celulares) até a ativação de vias neuroendócrinas. O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA, do inglês, *hypothalamic-pituitary-adrenal*) é um sistema regulador que integra funções tanto neuronais como endócrinas no organismo. Com a função de manter a homeostase relacionada ao estresse, o eixo HPA conta com um complexo sistema de atuação hormonal, onde hormônios glicocorticoides exercem funções anti-inflamatórias através de seus ubiquamente expressos receptores – receptores de glicocorticoides (GRs) –, que quando ativados, migram do citoplasma para o núcleo e atuam em conjunto com fatores de transcrição para conter a resposta inflamatória – estimulando a expressão de sinalizadores anti-inflamatórios (como a Interleucina-10 (IL-10)) e inibindo a expressão de sinalizadores pró-inflamatórios – e para mediar um sistema de retroalimentação negativa, em que diversos hormônios participam, tais como o de liberação de corticotrofina (CRH), o adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticoides (principalmente o cortisol, em humanos, e a corticosterona (CORT), em ratos e camundongos) (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005).

Este *feedback*, de forma resumida, consiste em regular a liberação de glicocorticoides através de duas principais vias: (i) inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, que são capazes de estimular a secreção de hormônios que ativam o eixo HPA, resultando na inibição deste; e (ii) inibindo a expressão tanto do CRH como do ACTH pela liberação de glicocorticoides, onde o próprio hormônio serve como um interruptor para o seu funcionamento (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Na grande maioria dos estudos, níveis elevados de cortisol são encontrados em pacientes com quadros neuroinflamatórios/neurodegenerativos (CHROUSOS; ZAPANTI, 2014; HERRERO et al., 2015; HOLSBOER, 2000; SHINDEL; HOLLAND; GALLAGHER-THOMPSON,

2020), sendo este fato explicado, segundo muitos autores, pela possível resistência de GRs a glicocorticoides nas células, fazendo com que o número de moléculas de cortisol/CORT na circulação seja alto, visto a falta de interação deste com seus receptores, afetando o diálogo do cortisol/CORT com o sistema imune, e causando um distúrbio em seu *feedback* negativo (MCQUADE; YOUNG, 2000; RODRIGUEZ et al., 2016; SCHAAF; CIDLOWSKI, 2002).

O modelo animal de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de parede bacteriana vem sendo amplamente utilizado para o estudo de condições inflamatórias. Sua principal vantagem se dá no desenvolvimento de duas condições paralelamente dependentes: a inflamação sistêmica e a neuroinflamação. Por ser capaz de induzir uma Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica com um alto grau de reprodutibilidade, e visto que esta está altamente relacionada com a inflamação sistêmica e com a neuroinflamação, ambos os estudos da neuroinflamação e da inflamação sistêmica, tal como a sepse, acabam podendo ser investigados por este mesmo modelo (FREISE; BRÜCKNER; SPIEGEL, 2001). Quando injetado intraperitonealmente, o LPS é reconhecido por receptores de padrões moleculares associados a patógenos, tanto em células periféricas como em células do SNC (visto que este é capaz de atravessar a BBB), induzindo a ativação de cascatas intracelulares de sinalização pró-inflamatórias, e levando à expressão de citocinas e de demais mediadores da inflamação (BROWN, 2019; DICKSON; LEHMANN, 2019), propiciando o estabelecimento de um quadro inflamatório.

Diversos protocolos experimentais já foram estabelecidos, variando a dose, a periodicidade e a forma de administração de LPS (BATISTA et al., 2019). Em um trabalho publicado em 2007, os autores demonstraram que uma injeção intraperitoneal única de LPS (5 mg/kg, i.p.) leva à ativação neuroimune em períodos inferiores a três horas, durando por até 10 meses após o insulto (QIN et al., 2007).

O Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas, intimamente relacionada com processos inflamatórios, sendo capaz de interagir com múltiplos ligantes (TEISSIER; BOULANGER, 2019). Dentre eles, se destacam os AGEs (*Advanced Glycation Endproducts*, como a N(6)-Carboximetilisina, CML), a S100B (*S100 calcium-binding protein B*), a HMGB1 (*High mobility group box 1 protein*) e a HSP70 (*Heat-shock protein 70*), além de inúmeras outras moléculas associadas a padrões moleculares, como o próprio LPS. Ao interagir com um de seus ligantes, este receptor induz uma cascata de sinalização intracelular que muitas vezes resulta na ativação do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B), culminando na expressão de inúmeros mediadores pró-inflamatórios, provocando também a produção de mais cópias do próprio RAGE. Por

compartilhar vias de sinalização com outras rotas pró-inflamatórias, o RAGE acaba formando um ciclo de retroalimentação positiva, onde sua ativação perpetua e mantém um quadro inflamatório (XIE et al., 2013).

O RAGE é encontrado em vários tipos celulares, tendo sua expressão a nível imunológico – a nível de células do sistema imune –, como um fator fundamental para a manutenção e propagação da inflamação, visto que sua inibição é capaz de reverter e/ou prevenir a condição (PRANTNER et al., 2020). A nível de SNC, o RAGE é expresso tanto por células endoteliais como por neurônios e células gliais. Sua participação direta na neuroinflamação é robusta: ele atua tanto no transporte de compostos através da BBB, como na atividade e metabolismo de neurônios, astrócitos e células da micróglia (JURANEK et al., 2015). Sua ablação a nível de tecido nervoso também retoma fenótipos fisiológicos, demonstrando seu importante papel no desenvolvimento da neuroinflamação (GASPAROTTO et al., 2018).

Em 2012 foi desenvolvido um antagonista sintético de RAGE, o FPS-ZM1 (DEANE et al., 2012). Esta molécula é capaz de se ligar reversivelmente ao receptor, impedindo que este interaja com seus ligantes. Por cruzar facilmente a BBB e por interagir com alta especificidade com o RAGE, o FPS-ZM1 acaba sendo visto como um ótimo inibidor para se estudar a função desta proteína. Diferentes concentrações do composto já foram testadas em vias intraperitoneais e encefálicas de administração, tendo um efeito positivo – em termos de resgate – em variados modelos animais de neuroinflamação (DEANE et al., 2012; GASPAROTTO et al., 2017; HONG et al., 2016; SHEN et al., 2021; ZHOU et al., 2017).

A relevância das vias intranasais de administração de fármacos vem chamando a atenção da comunidade científica nos últimos anos, pois através dos nervos olfatórios e trigêmeos, compostos são capazes de penetrar o tecido nervoso diretamente, sem precisar passar pela corrente sanguínea (CROWE et al., 2018). Deste modo, as vias intranasais evitam efeitos adversos originados de vias sistêmicas de administração (ERDŐ et al., 2018). Ainda que o FPS-ZM1 seja lipossolúvel, cruzando a BBB com facilidade, sua administração sistêmica acaba levando este fármaco a interagir com o RAGE expresso em tecidos periféricos, mascarando os possíveis efeitos que a droga possa exercer a nível de SNC, especialmente em modelos animais de inflamação sistêmica. Levando isso em consideração, a administração intranasal de FPS-ZM1 acaba se tornando um potencial alvo de investigação para o estudo da função do RAGE no SNC, especialmente quando comparada a outras formas de administração mais invasivas, como por injeções intracerebroventriculares ou até mesmo por injeções diretas em tecidos nervosos.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Considerando: (i) a relevância da modulação neuroinflamatória na progressão de doenças neurodegenerativas; (ii) a importância do papel do RAGE na resposta inflamatória; (iii) o proeminente potencial terapêutico exercido pela inibição encefálica de RAGE através de seu antagonista FPS-ZM1 em modelos animais de neuroinflamação; e (iv) a falta de estudos que investigam formas alternativas de administração deste fármaco no SNC, como pela via intranasal, o presente projeto tem como objetivo o de *investigar os efeitos da administração intranasal de FPS-ZM1 na interação com o RAGE em um modelo animal de neuroinflamação induzida por uma injeção sistêmica única de LPS*.

Como objetivos específicos, e relacionados ao modelo animal utilizado, este projeto visa:

1. Investigar os possíveis efeitos cognitivos-comportamentais desempenhados pela administração intranasal de FPS-ZM1;
2. Estudar o impacto da inibição de RAGE nos níveis deste e de seus ligantes (CML, S100B, HMGB1 e HSP70), tanto no soro como no CSF, assim como;
3. Avaliar os níveis de marcadores séricos e do CSF relacionados à inflamação (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e CORT) e ao dano oxidativo (4-HNE e Nitrotirosina).

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Anticorpos policlonais para IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, 4-HNE e CML, e monoclonal para Nitrotirosina foram comprados da *Abcam*® (Cambridge, UK). Anticorpos policlonais para S100B, HMGB1 e HSP70, e monoclonal para RAGE foram obtidos da *Santa Cruz Biotechnology, Inc* (Dallas, TX, USA). O anticorpo policlonal para CORT foi obtido da *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA). O lipopolissacarídeo de parede bacteriana, LPS, de *Escherichia coli* O111:B4, e o antagonista de RAGE, FPS-ZM1, foram comprados da *MilliporeSigma*® (Burlington, MA, USA). Microplacas para ELISA foram compradas da *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, CA, USA). Anticorpos secundários conjugados a peroxidases – anti-Rabbit, -Mouse e -Goat – foram comprados da *Cell Signalling Technology* (Danvers, MA, USA) e da *Thermo Fisher Scientific*. Albumina de Soro Bovino e TMB foram obtidos da *INLAB Confiança* e da *Life Technologies* (CA, USA), respectivamente. Demais reagentes utilizados neste estudo eram de pureza analítica ou de grau de cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2 Declaração Ética

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al., 2010) e da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (CEUA-UFRGS), sob o projeto de número #37134.

3.3 Animais

Ratos *Wistar* machos com 60 dias de vida foram obtidos através do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS). Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura constante de $21 \pm 0,1$ °C, em ciclos claro-escuro de 12 horas. Eles foram separados em grupos de até 4 animais por caixa, tendo acesso livre (*ad libitum*) à água e à comida (*Chow Nuvilab CR-1 type*; PR, Brasil). Todos os animais foram manipulados durante o período de 7 dias antes do início dos experimentos, a fim de reduzir o estresse causado por futuras manipulações (pesagens, injeções, etc.).

3.4 Desenho Experimental

Inicialmente, 70 animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais, conforme ilustrado na Figura 1A. Devido à alta mortalidade resultante da condição endotoxêmica promovida pela injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.), 47 animais restaram para a realização o estudo. Os grupos Controle, FPS e LPS tiveram um n = 12, enquanto que o grupo LPS+FPS, um n = 11. O procedimento experimental pode ser visto na Figura 1B. Cada animal recebeu, no dia 0 (com 67 dias de vida), uma injeção intraperitoneal ou de solução salina 0,9% (Controles e FPS) ou de LPS 2 mg/kg (LPS e LPS+FPS). 64 dias depois, todos os animais passaram por 3 sessões de ambientação à administração intranasal, recebendo uma dose de solução salina 0,9% a cada dois dias. A partir do dia 70, os animais iniciaram o tratamento intranasal, recebendo 7 doses ou de veículo (Controles e LPS) ou de FPS-ZM1 (totalizando 1,2 mg; grupos FPS e LPS+FPS), finalizando no dia 82 (cada dose foi dada a cada dois dias). Nos dias 88 e 89, os ratos foram submetidos ao Teste de Campo Aberto (OFT, do inglês, *Open Field Test*), e no dia 90, perfundidos e eutanasiados.

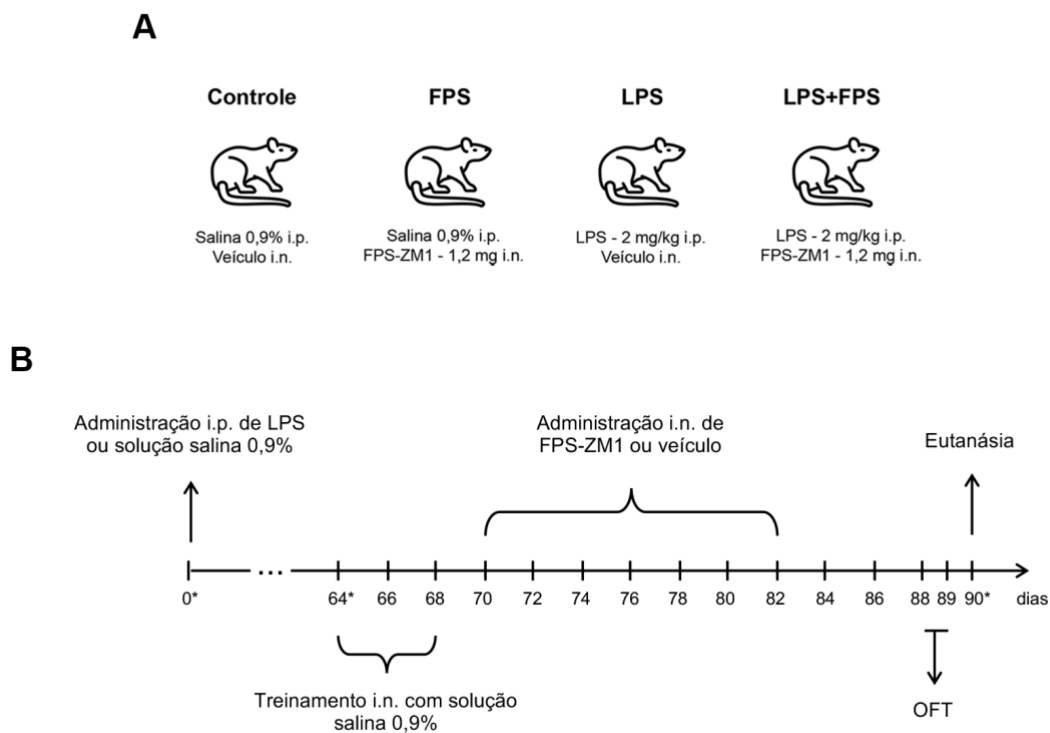


Figura 1: Desenho experimental. (A) grupos experimentais definidos para o estudo. A quantidade de 1,2 mg de FPS-ZM1 administrada nos grupos FPS e LPS+FPS se refere à soma das 7 doses aplicadas no estudo. (B) linha do tempo ilustrando os procedimentos aplicados na investigação. Os dias com asterisco (*) ao lado (0, 64 e 90) se referem aos dias em que os animais foram pesados. Abreviações: i.p. – intraperitoneal; i.n. – intranasal; LPS – lipopolissacarídeo; OFT – Teste de Campo Aberto.

3.5 Preparo e administração intraperitoneal de LPS

O LPS foi diluído em solução salina 0,9%, atingindo uma concentração de 2 mg/mL. Com essa concentração, cada animal dos grupos LPS e LPS+FPS recebeu intraperitonealmente um volume (em microlitros) equivalente ao seu peso (em gramas), para que a dose de 2 mg/kg de LPS fosse alcançada. Similarmente, os ratos dos grupos Controle e FPS receberam intraperitonealmente um volume de solução salina 0,9% igual aos seus pesos. Tanto as administrações de LPS como as de solução salina foram dadas no início da tarde, por volta das 13 horas.

3.6 Preparo e administração intranasal de FPS-ZM1

Para a administração intranasal, tanto nos dias de habituação como nos dias de tratamento, os procedimentos foram os mesmos (adaptados de PANG et al., e de TIEFENSEE RIBEIRO et al.). Com o animal parcialmente imobilizado, e com a ajuda de uma micropipeta, 4 μ L de solução (salina, veículo ou de FPS-ZM1) eram dispostos nas proximidades da narina do rato, para que este pudesse inalar os compostos através de sua respiração natural. As aplicações intranasais foram realizadas unilateralmente, porém, para cada dia de aplicação, as narinas eram alternadas (e.g., dia 64 na direita, dia 66 na esquerda, dia 68 na direita...). É importante ressaltar que nenhum animal demonstrou sinal de estresse durante os procedimentos. Todas as administrações intranasais foram realizadas no meio da tarde, por volta das 15 horas.

Por ser altamente lipofílico, o FPS-ZM1 foi diluído em DMSO. As quantidades de FPS-ZM1 dadas em cada uma das 7 doses estão destacadas na Tabela 1. Os grupos FPS e LPS+FPS receberam 5 doses de 0,2 mg e 2 doses de 0,1 mg de FPS-ZM1, diluídas em 4 μ L de DMSO, enquanto que os grupos Controle e LPS receberam 7 doses iguais de 4 μ L de veículo (DMSO).

	Dia 70	Dia 72	Dia 74	Dia 76	Dia 78	Dia 80	Dia 82
Volume de solução administrada	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
Quantidade de FPS-ZM1	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,1 mg

Tabela 1: Quantidade de FPS-ZM1 administrada em cada dia de tratamento. Após 3 sessões de treinamento com solução salina 0,9% nos dias 64, 66 e 68, os animais passaram por 7 dias de tratamento intranasal, recebendo doses ou de FPS-ZM1 (diluídas em DMSO; grupos FPS e LPS+FPS), ou de veículo (DMSO; grupos Controle e LPS). A quantidade total de FPS-ZM1 administrada para cada animal dos grupos FPS e LPS+FPS foi de 1,2 mg.

3.7 Teste de Campo Aberto

Nos dias 88 e 89, todos os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto. O procedimento utilizado foi adaptado de POVEDA et al. O aparato/arena do OFT consiste em uma caixa preta de 50 x 50 x 50 cm, dividida em 16 quadrantes de mesmo tamanho. No primeiro dia de testagem (dia de treinamento), cada rato foi posto individualmente no centro do aparato, e lhes foi permitido explorar o ambiente por um período de 10 minutos. 24 horas depois (no dia de teste), o mesmo procedimento foi empregado. Os testes foram gravados em ambos os dias por uma câmera disposta sob o centro da arena, e os vídeos foram analisados pelo *software ANY-maze (Stoelting Co.; IL, USA)*. Os parâmetros investigados para o estudo foram: (i) a distância total viajada, (ii) o número de episódios e (iii) o tempo de *freezing*, (iv) o tempo no centro (nos 4 quadrantes centrais) e (v) o tempo nas esquinas (nos 12 quadrantes laterais).

4 aparatos (caixas) foram utilizados conjuntamente, permitindo a testagem simultânea de 4 animais. Os equipamentos eram limpos individualmente com álcool 70% antes de cada animal ser testado. Todos os ratos foram habituados à sala de testagem por um período de 1 hora antes do início dos experimentos, em ambos os dias. Animais com um tempo de imobilidade superior a 450 segundos, em qualquer dia de análise, foram excluídos do estudo.

3.8 Eutanásia e Coleta de Soro e de Líquido Cefalorraquidiano

A eutanásia ocorreu no dia 90 após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.). Os animais foram anestesiados com uma dose única de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para a coleta de sangue e CSF. Após, foram perfundidos e tiveram os cérebros coletados para futuras análises.

O CSF dos ratos foi coletado de forma similar à descrita anteriormente (LI et al., 2016; NIROGI et al., 2009). Resumidamente, os animais foram postos em um aparelho estereotáxico, firmando suas cabeças em um ângulo de aproximadamente 45°, a fim de facilitar a visualização e a inserção de uma agulha na depressão superficial localizada entre a protuberância occipital e a vértebra C1. Inserindo uma agulha 26g no espaço subaracnóide, aproximadamente 100 µL de CSF foram coletados por rato. Após coleta, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g e a 4°C, tendo os sobrenadantes coletados, aliquotados e estocados em *freezer* de -80°C até futuras análises. Amostras contaminadas com sangue foram removidas do estudo.

A coleta de sangue se deu por punção cardíaca. Antes de iniciar o procedimento de perfusão, aproximadamente 3 mL de sangue foram coletados diretamente do coração dos

animais, com a utilização de uma seringa de 5 mL com uma agulha 20g. As amostras de sangue recém coletadas foram transferidas para tubos para sorologia (*Vacuplast*). Uma vez transferidas, foram centrifugadas por 15 minutos a 1.200 g a temperatura ambiente, e tiveram os sobrenadantes (soro) coletados, aliquotados e estocados em *freezer* de -80°C até futuras análises. Após a coleta de sangue, os animais foram perfundidos via sistema vascular, com a aorta descendente clampeada. 10 minutos de perfusão com solução salina 0,9% estéril foram seguidos de mais 10 minutos de perfusão com solução de PFA 4%, diluído em PBS (pH 7,4). Os cérebros dos animais foram coletados, crioprotetidos e armazenados em *freezer* de -80°C até futuras análises.

3.9 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas do soro e do CSF foram acessadas pelo método de *Bradford* (BRADFORD, 1976).

3.10 *Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA Indireto)

O mesmo protocolo de ELISA foi utilizado tanto para as amostras de soro como para as amostras de CSF. Após dosagem de proteínas, todas as amostras foram normalizadas e diluídas em PBS até chegar numa concentração proteica de 5 µg/ml. Para cada placa de ELISA, 75 µL de amostra (diluída) foram pipetados por poço. Depois de 24 horas de incubação em câmara fria, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL de tampão de lavagem (PBS + 0,05% *Tween* 20). Os poços foram incubados, por 3 horas à temperatura ambiente, com 200µL de solução de BSA (1,0%, *w/v*), diluída em PBS, para bloquear sítios de ligação inespecífica. Após 3 lavagens, 100 µL de solução de anticorpo primário (diluído em tampão de lavagem + 0,5% BSA, *w/v*) foram adicionados por poço, deixando reagir *overnight* a uma temperatura de 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes novamente, e foram adicionados 100 µL de solução de anticorpo secundário (IgG acoplado a uma peroxidase, diluído em tampão de lavagem) por poço. Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente, 4 lavagens foram realizadas, seguidas da adição de 100 µL de TMB em cada poço. A reação foi parada com a adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2 M por poço, e cada placa foi lida individualmente em um aparelho *SpectraMax i3 Multi-Mode Platform*® (*Molecular Devices*, USA) no comprimento de onda de 450 nm. As densidades ópticas (ODs) obtidas foram

normalizadas em relação ao grupo Controle, e analisadas em forma de porcentagem. Não foram feitas curvas padrões para os analitos investigados (método semi-quantitativo). As concentrações de anticorpos, tanto dos secundários como dos primários podem ser vistas na Tabela 2. As diluições foram feitas com base em dados da literatura e/ou em dados fornecidos pelos fabricantes dos produtos.

Anticorpo	Diluição	Anticorpo	Diluição
anti-TNF- α (ab6671)	1:5.000	anti-RAGE (SC 365154)	1:2.000
anti-IL-1 β (ab9722)	1:5.000	anti-CML (ab27684)	1:10.000
anti-IL-6 (ab6672)	1:5.000	anti-S100B (SC 28533)	1:10.000
anti-IL-10 (ab9969)	1:5.000	anti-HMGB1 (SC 26451)	1:1.000
anti-CORT (PA124900)	1:400	anti-HSP70 (SC 1060)	1:1.000
anti-4-HNE (ab46545)	1:10.000	anti-Rabbit (#7074)	1:5.000
anti-Nitrotirosina (ab7048)	1:4.000	anti-Mouse (#7076); anti-Goat (#31402)	1:2.000

Tabela 2: Diluições de anticorpos para ELISA indireto. As diluições dos anticorpos primários e secundários foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante ou de acordo com dados presentes na literatura. O volume pipetado por poço foi de 100 μ L. Os anticorpos foram diluídos em tampão de lavagem (PBS + 0,05% Tween 20) + 0,5% BSA (w/v). A concentração e volume de amostra pipetados em cada poço foram de 5 μ g/mL e 75 μ L, respectivamente.

3.11 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism*, versão 8.0 (*GraphPad Software Inc.*; San Diego, USA). Os dados foram analisados para normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino. A homocedasticidade dos resíduos foi checada através do teste de Bartlett. Testes t de Student foram utilizados para comparar médias de famílias com 2 grupos. ANOVAs de uma via foram utilizadas para comparar médias de famílias com 3 ou mais grupos. Testes *post-hoc* de *Dunnet* e *Tukey* foram empregados quando as ANOVAs deram resultados significativos. No caso de famílias que passaram por mais de um teste estatístico, estes foram corrigidos pelo método de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$. Resultados estão representados como Média \pm Desvio Padrão (Média \pm DP).

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento intranasal com FPS-ZM1 não reverte diminuição de ganho de peso induzida por administração sistêmica aguda de LPS

Conforme ilustrado na Figura 1B, os animais tiveram seus pesos acessados nos dias 0 (antes de realizar a injeção de LPS; 2 mg/kg, i.p.), 64 (antes de iniciar o tratamento intranasal com FPS-ZM1; 1,2 mg, i.n.) e 90 (no dia da eutanásia). Como as administrações intranasais de FPS só ocorreram após o dia 64, os pesos dos ratos nos dias 0 e 64 foram comparados entre os animais que receberam uma injeção i.p. de solução salina 0,9% (animais dos grupos Controle e FPS, $n = 24$; Salina) e os que receberam uma injeção i.p. de 2 mg/kg de LPS (animais dos grupos LPS e LPS+FPS, $n = 23$; LPS).

Como esperado, entre os dias 0 e 64, os ratos de ambos os grupos tiveram um aumento de massa corpórea, independentemente de terem recebido uma injeção de solução salina ou de LPS (Figura 2A). Nenhuma diferença foi encontrada entre a média dos pesos dos grupos analisados no dia 64 (teste t de Student não pareado, $P = 0,658$).

Em um espaço de tempo mais curto, e agora analisando os efeitos do tratamento intranasal com FPS-ZM1, foi visto que, ao contrário dos animais controles, aqueles injetados com LPS não tiveram um aumento significativo de peso entre os dias 64 e 90; e que o tratamento intranasal com FPS-ZM1 não foi capaz de reverter este fenômeno (Figura 2B). Assim como para o dia 64, nenhuma diferença foi encontrada entre a média dos pesos dos grupos analisados no dia 90 (ANOVA de uma via, $P = 0,385$). Esta aparente discrepância observada entre os resultados (diferença de peso entre os dias 64 e 90 para os grupos Controle e FPS, e ausência de diferença para os grupos LPS e LPS+FPS, somada à ausência de diferença entre os pesos de todos os grupos nos dias 64 e 90) pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo maior poder estatístico dos testes t de Student pareados, quando comparados às análises de variâncias e aos testes t de Student não pareados.

Em conjunto, estes resultados indicam que a condição endotoxêmica promovida pela administração aguda de LPS (2 mg/kg, i.p.) não altera, ao final dos primeiros dois meses, o ganho de peso dos animais, porém, parece desacelerar este processo em períodos posteriores. Também é possível destacar que o tratamento intranasal com FPS-ZM1 (1,2 mg) não é capaz de resgatar, a nível de animais controles, este padrão visto nos animais injetados com LPS.

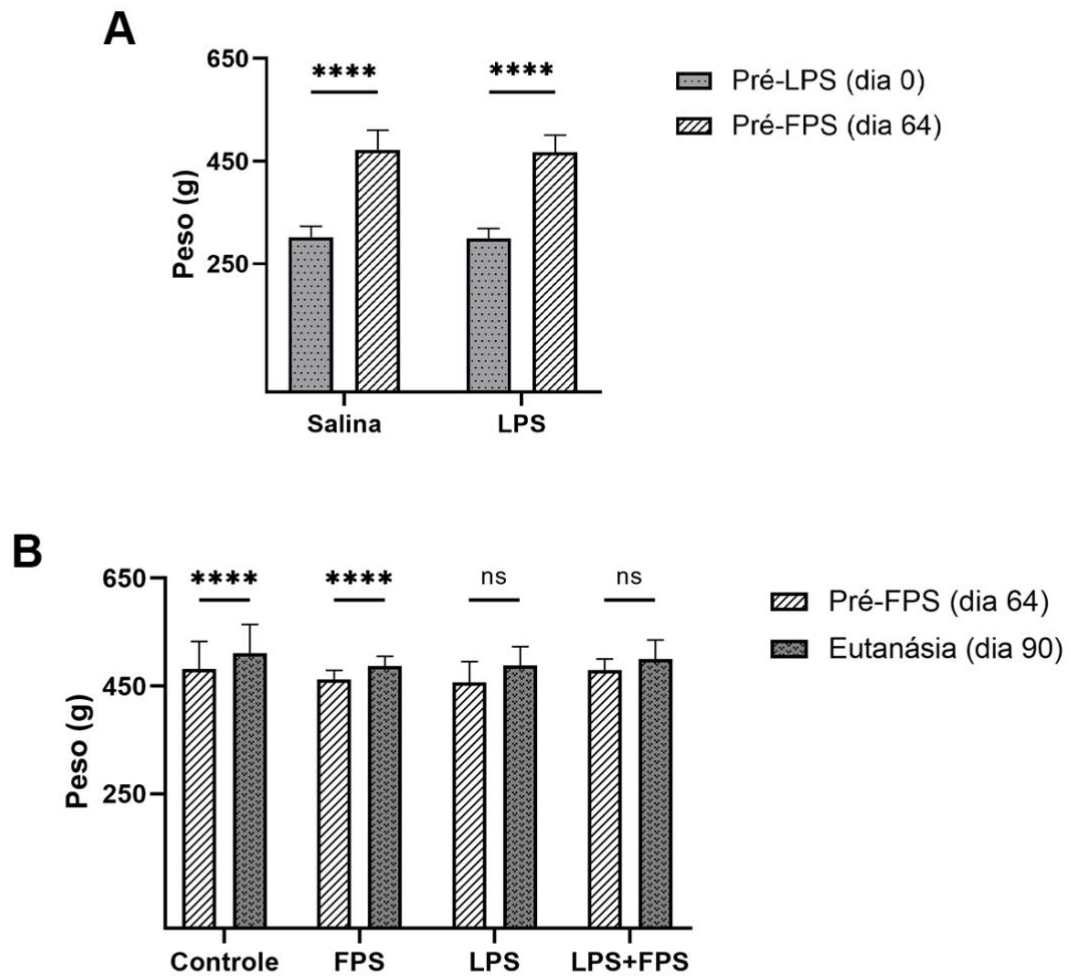


Figura 2: Pesagens. Todos os animais foram pesados antes da administração intraperitoneal de 2 mg/kg de LPS (Pré-LPS, dia 0), antes do tratamento intranasal com 1,2 mg de FPS-ZM1 (Pré-FPS, dia 64) e no dia da eutanásia (dia 90). (A) pesos dos animais que receberam ou uma injeção i.p. de salina (Salina; grupos Controle + FPS; $n = 24$) ou uma injeção i.p. de LPS (LPS; grupos LPS + LPS+FPS; $n = 23$) nos dias 0 e 64. (B) pesos dos animais nos dias 64 e 90. Para os grupos Controle, FPS e LPS, $n = 12$. Para o grupo LPS+FPS, $n = 11$. Resultados estão expressos como Média \pm DP. **** $P < 0,0001$. Diferenças estatísticas demonstradas na figura foram investigadas através de testes t de Student pareados. Testes t de Student não pareados e ANOVA de uma via não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos em nenhum dos dias analisados. Por utilizar mais de uma análise estatística em uma mesma família, os valores de P foram ajustados pelo método de Bonferroni.

4.2 FPS-ZM1 intranasal reverte déficits locomotores e cognitivos-comportamentais induzidos por administração sistêmica aguda de LPS

Nos dias 88 e 89, todos os animais foram submetidos ao OFT. Conforme discutido na seção 3.7, a arena do OFT foi dividida em 16 quadrantes, agora mostrados na Figura 3A. Dos 16 quadrantes estabelecidos, 12 foram designados à zona lateral (os quadrantes mais próximos às paredes), e os 4 restantes, à zona central (os quadrantes que compõem o centro do aparato). Parâmetros locomotores e cognitivos-comportamentais foram acessados comparando as performances individuais nos dias de treinamento e teste, através de testes t de Student pareados. Para lidar com *outliers*, e evitar enviesamento estatístico, um parâmetro e valor de *cut-off* foi estabelecido: animais que tiveram um tempo de imobilidade superior a $\frac{3}{4}$ do tempo total de teste (450 segundos em cada dia) foram removidos do estudo. Desta forma, tivemos um n total de 41 animais, dos quais: grupo Controle, n = 11; FPS, n = 11; LPS, n = 11; LPS+FPS, n = 8.

Analisando os resultados, vemos que, no dia de teste, os animais injetados com LPS tiveram uma diminuição na distância total viajada quando comparada ao dia de treinamento ($P = 0,034$), ao contrário dos grupos Controle ($P = 0,104$), FPS ($P = 0,108$) e LPS+FPS ($P = 0,336$), nos quais não foram encontradas tais diferenças, conforme mostrado na Figura 3B. Assim, vemos que o tratamento intranasal com FPS-ZM1 reverte o aparente déficit locomotor induzido pelo LPS.

Similarmente, apenas o grupo LPS apresentou um aumento no número de episódios ($P = 0,0284$; Figura 3C) e no tempo de *freezing* ($P = 0,0496$; Figura 3D), assim como uma tendência a ficar mais tempo nas zonas laterais ($P = 0,0146$; Figura 3E), e menos tempo nas zonas centrais do aparato ($P = 0,0146$; Figura 3F), quando comparados aos valores obtidos no dia de treinamento, ao contrário dos grupos Controle, FPS e LPS+FPS, onde tais diferenças não foram vistas. Novamente, o tratamento com FPS-ZM1 parece estar revertendo os fenótipos observados nos animais injetados com LPS, neste caso, relacionados a indicadores de performance cognitiva-comportamental.

Análises de variâncias não demonstraram nenhuma diferença estatística entre as médias dos grupos em nenhum dos parâmetros analisados, tanto nos dias de teste como nos dias de treinamento (valores de P podem ser vistos na Tabela 3). Outra vez, destacamos o alto poder estatístico dos testes t de Student pareados (em relação às análises de variâncias não pareadas) para detectar flutuações sutis entre intervalos de tempo, por comparar cada animal par a par.

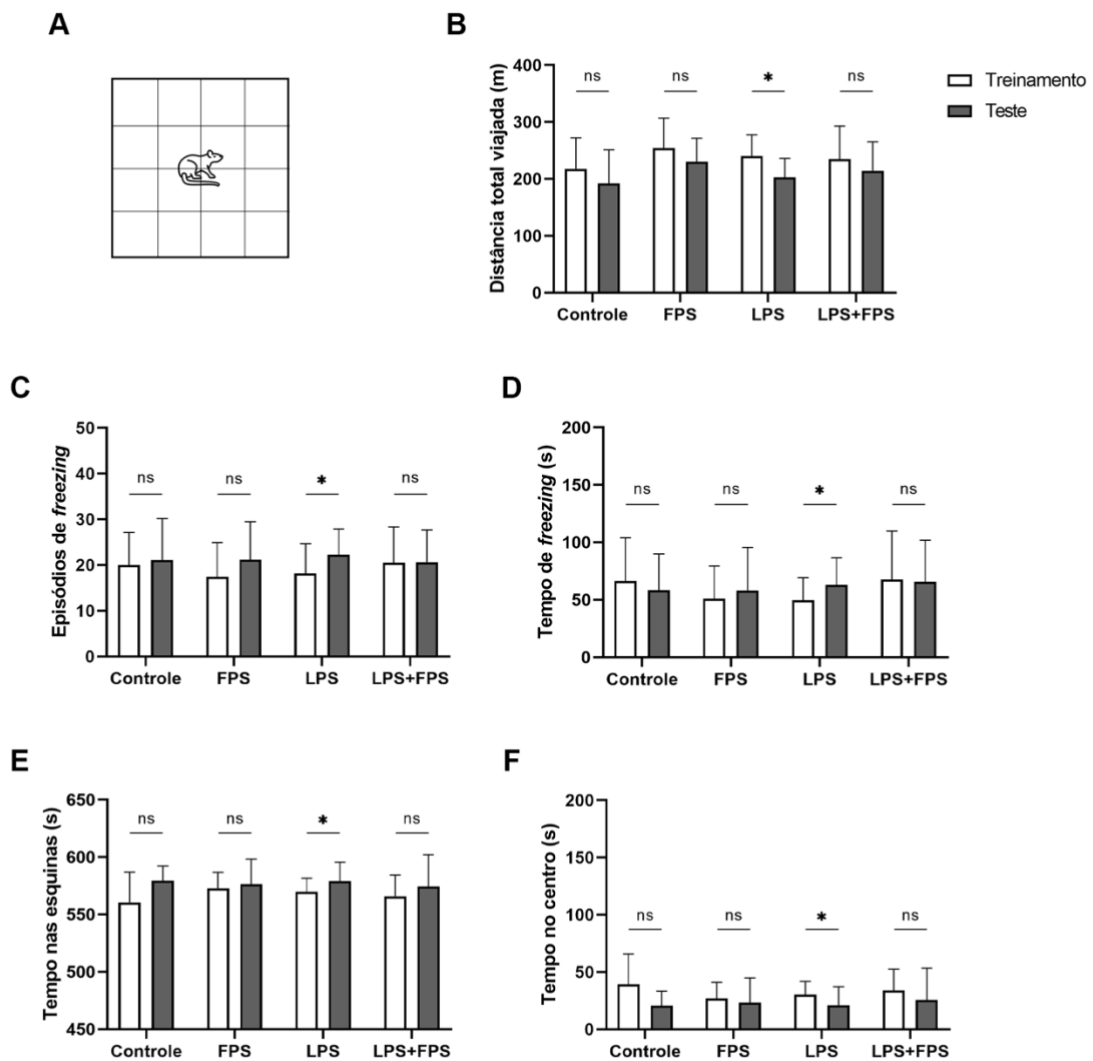


Figura 3: Teste de Campo Aberto. Parâmetros locomotores e cognitivos-comportamentais foram acessados nos quatro grupos experimentais do estudo nos dias 88 e 89 após injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.). (A) 16 quadrantes formam a arena onde os animais foram analisados. Os parâmetros (B) distância total viajada, (C) episódios de freezing, (D) tempo de freezing, (E) tempo nas esquinas e (F) tempo no centro foram analisados em relação aos dias de treinamento, através de testes t de Student pareados. Para os grupos Controle, FPS e LPS, $n = 11$. Para o grupo LPS+FPS, $n = 8$. Resultados estão expressos como Média \pm DP. * $P < 0,05$. ANOVAs de uma via não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum dos parâmetros em nenhum dos dias analisados (Tabela 3). Por utilizar mais de uma análise estatística em uma mesma família, os valores de P foram ajustados pelo método de Bonferroni.

	Distância total viajada	Episódios de <i>freezing</i>	Tempo de <i>freezing</i>	Tempo nas esquinas	Tempo no centro
Dia de Treinamento	$P = 0,8226$	$P = 0,999$	$P = 0,899$	$P = 0,8978$	$P = 0,8978$
Dia de teste	$P = 0,536$	$P = 0,999$	$P = 0,999$	$P = 0,999$	$P = 0,999$

Tabela 3: Valores de P das ANOVAs entre os grupos experimentais, nos diferentes dias do OFT. ANOVAs de uma via foram utilizadas para investigar diferenças entre os grupos nos diferentes dias do OFT. Como nenhuma diferença foi encontrada, nenhum teste post-hoc foi aplicado. Por utilizar mais de uma análise estatística em uma mesma família, os valores de P foram ajustados pelo método de Bonferroni.

4.3 Redução dos níveis de corticosterona no soro, induzida por administração sistêmica aguda de LPS, não é revertida por tratamento intranasal com FPS-ZM1

A fim de investigar, a nível sistêmico, os efeitos em longo prazo da administração de LPS (2 mg/kg, i.p.), e os possíveis impactos do tratamento intranasal com FPS, um perfil inflamatório e oxidativo foi traçado através de ELISAs indiretos e semi-quantitativos do soro dos animais. Nesta análise, investigamos mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-6), anti-inflamatórios (IL-10 e CORT) e relacionados ao balanço redox (4-HNE e Nitrotirosina). Os valores de absorvâncias obtidos pela leitura a 450 nm foram normalizados em relação à média dos controles. As médias resultantes de cada análise foram comparadas por ANOVAs de uma via, seguidas de teste *post-hoc* de Dunnet, avaliados em relação ao grupo Controle. Houveram problemas na aquisição de soro de 3 animais, resultando em um n total de 44 (Controle, n = 12; FPS, n = 11; LPS, n = 11; LPS+FPS, n = 10).

O perfil inflamatório pode ser visto na Figura 4. Nenhuma diferença estatística foi vista entre as médias dos grupos investigados para as citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , $P = 0,1999$; IL-1 β , $P = 0,368$; IL-6, $P = 0,9952$; e IL-10, $P = 0,2663$; ANOVAs de uma via) e para os marcadores de dano oxidativo (4-HNE, $P = 0,8528$; e Nitrotirosina, $P = 0,6203$; ANOVAs de uma via). Em contrapartida, vimos que os níveis de CORT estavam reduzidos nos animais injetados com LPS (Figura 4B; teste *post-hoc* de Dunnet, $P = 0,0047$, em relação aos animais controles), e que o tratamento intranasal com FPS-ZM1 não resgata, a níveis de controles, esta diminuição da concentração de CORT (teste *post-hoc* de Dunnet, $P = 0,0053$, em relação aos animais controles).

Soro

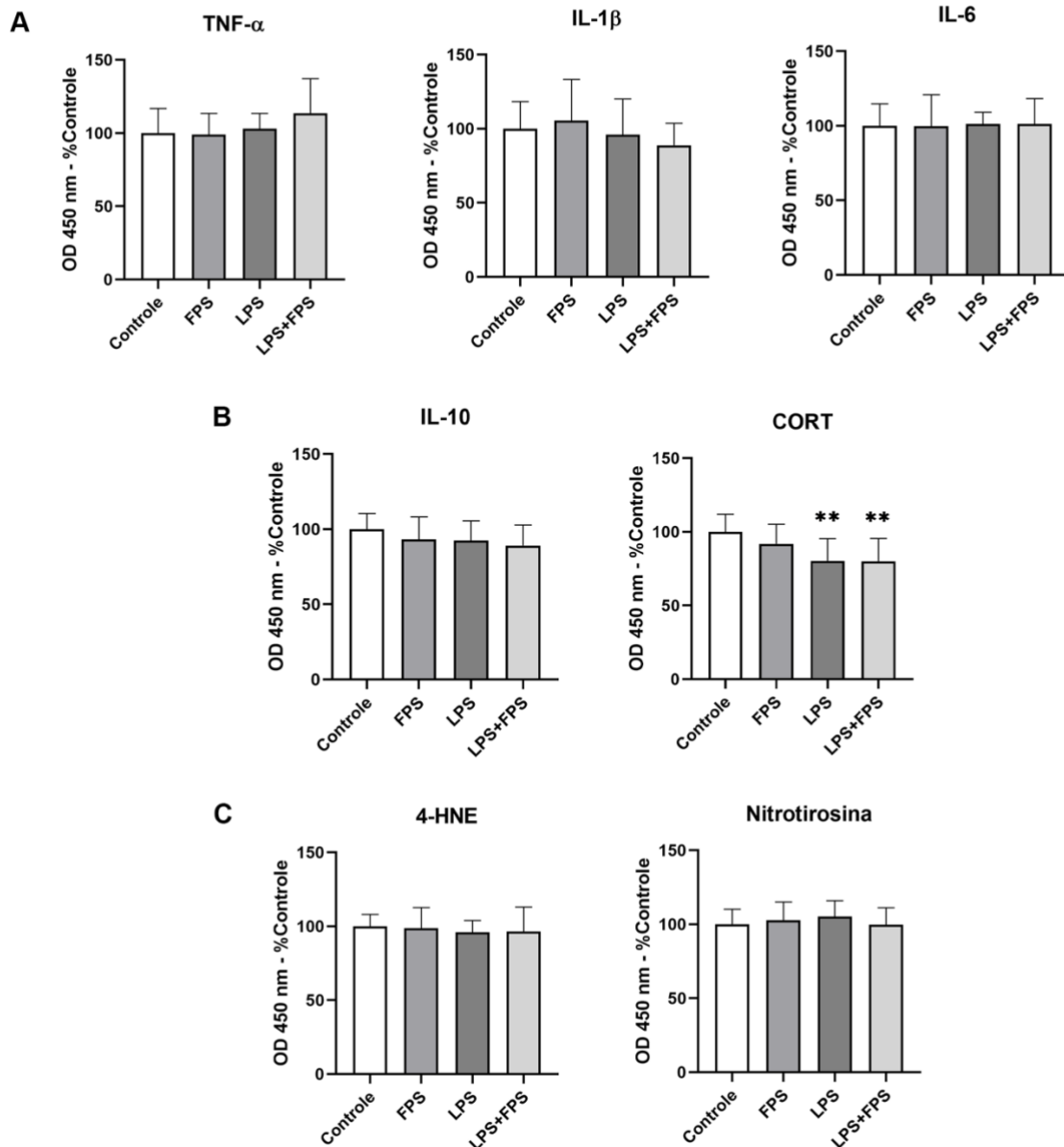


Figura 4: Perfil inflamatório e oxidativo – Soro. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos. (A) perfil pró-inflamatório: TNF- α , IL-1 β e IL-6; (B) perfil anti-inflamatório: IL-10 e CORT; e (C) perfil oxidativo: 4-HNE e Nitrotyrosina. Todas as análises estatísticas foram baseadas em ANOVAs de uma via seguidas de teste post-hoc de Dunnet. Controle, n = 12; FPS, n = 11; LPS, n = 11; LPS+FPS, n = 10. Resultados estão expressos como Média \pm DP. **P < 0,01, em relação ao grupo Controle.

Como era de se esperar, os níveis séricos de CORT apresentaram uma dependência em relação ao horário em que os animais foram eutanasiados, refletindo o ciclo circadiano dos ratos (Figura 5). Uma análise por regressão linear mostra que esta dependência dos níveis de CORT em relação ao tempo de coleta é explicada por um coeficiente de correlação $R = -0,703$, e uma estatística com valor de $P < 0,0001$.

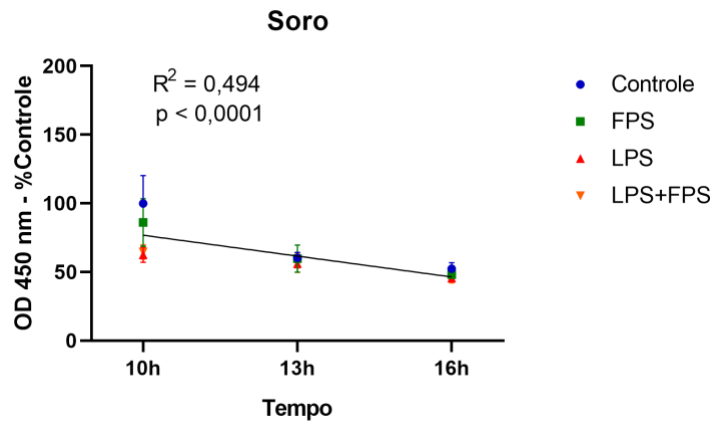


Figura 5: Regressão linear – tempo v. níveis relativos de CORT sérico. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos.

Similarmente ao perfil inflamatório e oxidativo, os níveis de RAGE e de seus principais ligantes também foram analisados no soro destes ratos (Figura 6). Através de ELISAs indiretos e semi-quantitativos, vimos que tanto o tratamento intranasal com FPS, como a administração aguda sistêmica de LPS, não alteram os níveis de RAGE ($P = 0,5767$) e de seus ligantes: CML ($P = 0,6506$), HMGB1 ($P = 0,6367$), S100B ($P = 0,4584$) e HSP70 ($P = 0,2481$), quando os grupos experimentais são comparados entre si (ANOVAs de uma via).

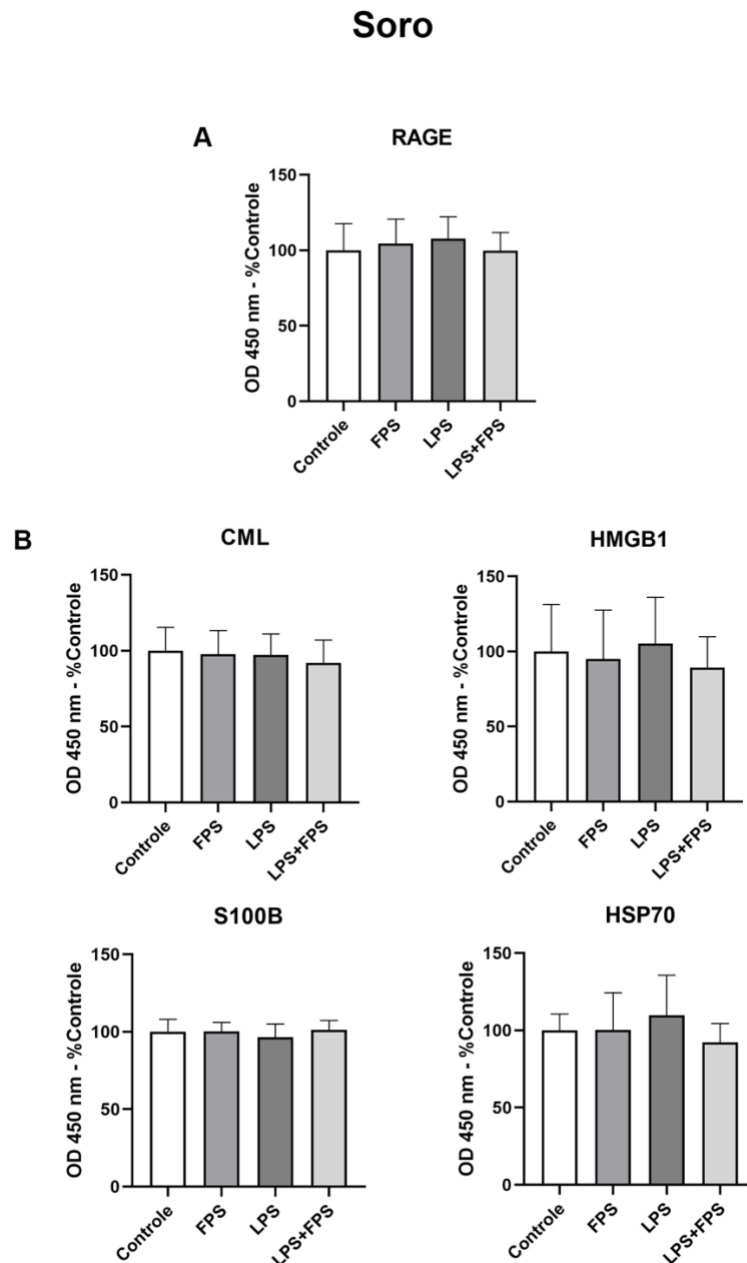


Figura 6: RAGE e seus ligantes – Soro. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos. (A) níveis relativos de RAGE; e (B) de seus ligantes: CML, HMGB1, S100B e HSP70. As análises estatísticas foram baseadas em ANOVAs de uma via seguidas de teste post-hoc de Dunnet. Controle, n = 12; FPS, n = 11; LPS, n = 11; LPS+FPS, n = 10. Resultados estão expressos como Média \pm DP.

4.4 Redução dos níveis de S100B no CSF em animais injetados intraperitonealmente com LPS é revertida com tratamento intranasal de FPS-ZM1

Para investigar parâmetros relacionados à neuroinflamação, e os possíveis efeitos que o tratamento intranasal com FPS-ZM1 pode exercer na condição proporcionada pela injeção sistêmica aguda de LPS, assim como o soro, o CSF dos animais foi investigado através de ELISAs indiretos e semi-quantitativos. A mesma metodologia utilizada para as análises dos níveis dos analitos no soro foi empregada para as análises do CSF. Dos 47 animais utilizados no estudo, somente 33 resultaram em amostras válidas de CSF, devido ou à contaminação com sangue, ou a volumes inferiores ao necessário para as análises (Controle, $n = 8$; FPS, $n = 9$; LPS, $n = 8$; LPS+FPS, $n = 8$).

O perfil inflamatório do CSF pode ser visto na Figura 7. Nenhuma diferença estatística foi vista – através de ANOVAs de uma via – entre as médias dos grupos investigados para os mediadores pró e anti-inflamatórios (TNF- α , $P = 0,1169$; IL-1 β , $P = 0,3477$; IL-6, $P = 0,1873$; IL-10, $P = 0,5514$; e CORT, $P = 0,6796$), assim como para os marcadores de dano oxidativo (4-HNE, $P = 0,4092$; e Nitrotirosina, $P = 0,6077$).

Curiosamente, os níveis relativos de CORT no CSF não demonstram uma boa correlação com o horário de amostragem, como indicado na Figura 8. A análise por regressão linear realizada mostra um coeficiente de correlação $R = 0,253$, e uma estatística com valor de $P = 0,1540$.

A investigação dos níveis de RAGE e de seus ligantes no CSF – comparando entre os diferentes grupos experimentais através de ANOVAs de uma via – não demonstraram diferenças estatísticas para os níveis de RAGE ($P = 0,5457$) e de seus ligantes CML ($P = 0,2338$), HMGB1 ($P = 0,3284$) e HSP70 ($P = 0,5562$). Os resultados podem ser vistos na Figura 9. Em contrapartida, os níveis de S100B mostraram-se aumentados nos animais injetados com LPS (teste *post-hoc* de Dunnet, $P = 0,0435$, em relação aos animais controles), e este fenótipo foi revertido pelo tratamento intranasal com FPS-ZM1 (teste *post-hoc* de Dunnet, $P = 0,999$, em relação aos animais controles).

CSF

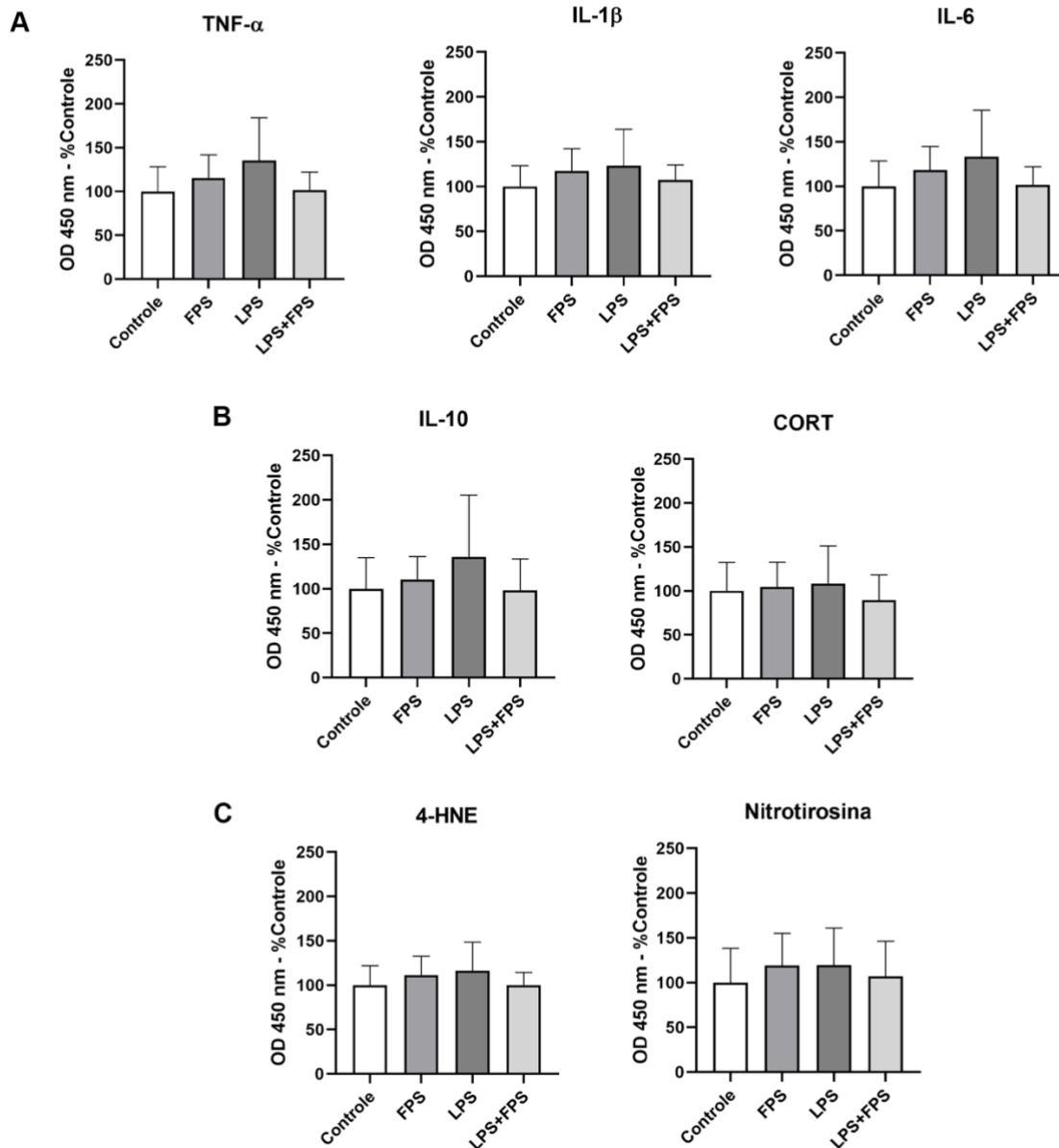


Figura 7: Perfil inflamatório e oxidativo – CSF. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos. (A) perfil pró-inflamatório: TNF- α , IL-1 β e IL-6; (B) perfil anti-inflamatório: IL-10 e CORT; e (C) perfil oxidativo: 4-HNE e Nitrotirosina. As análises estatísticas foram baseadas em ANOVAs de uma via seguidas de teste post-hoc de Dunnet. Controle, n = 8; FPS, n = 9; LPS, n = 8; LPS+FPS, n = 8. Resultados estão expressos como Média \pm DP.

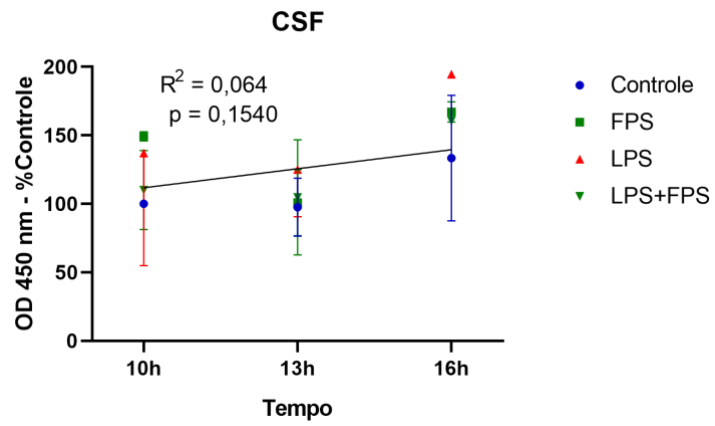


Figura 8: Regressão linear – tempo v. níveis relativos de CORT do CSF. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos.

CSF

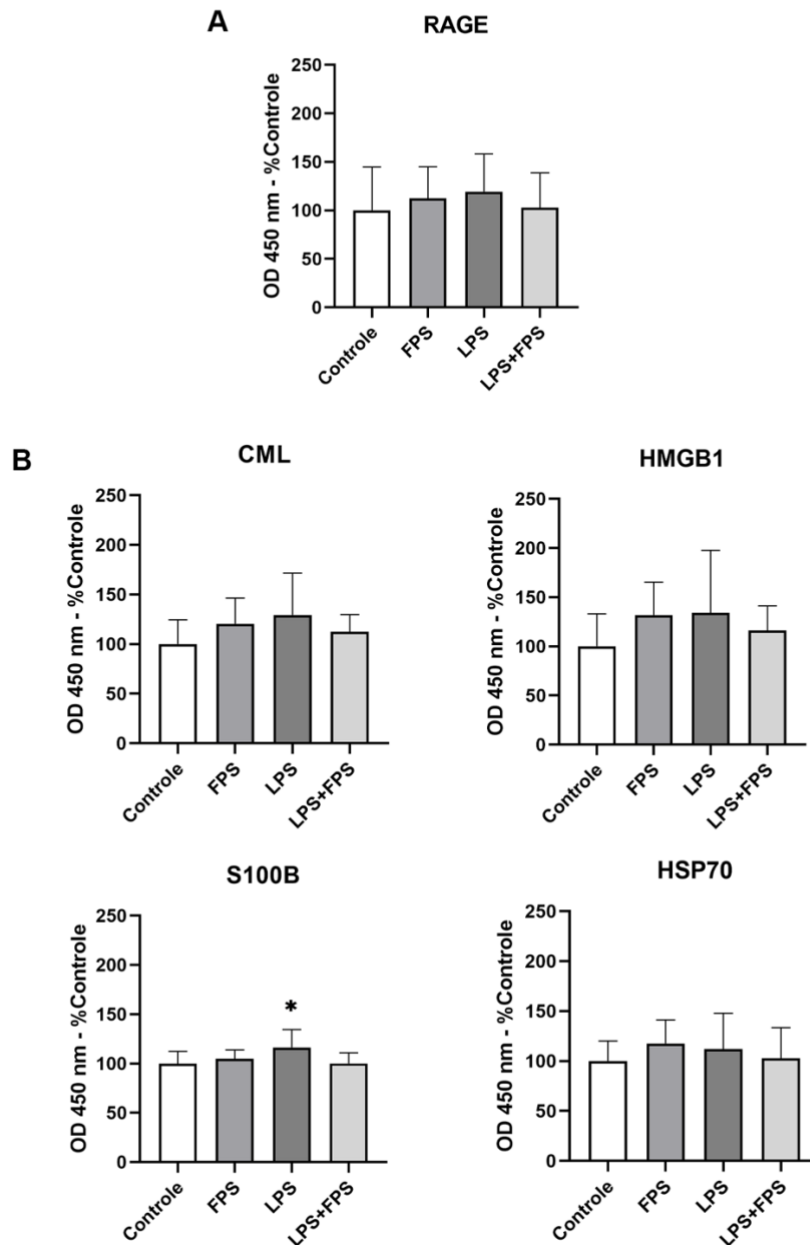


Figura 9: RAGE e seus ligantes – CSF. 90 dias após a injeção de LPS (2 mg/kg, i.p.) – 8 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos. (A) níveis relativos de RAGE; e (B) de seus ligantes: CML, HMGB1, S100B e HSP70. Todas as análises estatísticas foram baseadas em ANOVAs de uma via seguidas de teste post-hoc de Dunnet. Controle, n = 8; FPS, n = 9; LPS, n = 8; LPS+FPS, n = 8. Resultados estão expressos como Média ± DP. *P < 0,05, em relação ao grupo Controle.

4.5 Níveis alterados de corticosterona no soro, mas não de S100B no CSF, se relacionam com parâmetros cognitivos-comportamentais

Como houveram alterações dos níveis de CORT e de S100B, no soro e no CSF, respectivamente, buscamos relacioná-los à performance dos animais no OFT, para elucidar possíveis correlações entre os parâmetros estudados. Para este fim, análises por regressões lineares foram realizadas. Como o interesse se dá apenas nas diferenças entre os dias de treinamento e teste, os valores relacionados com os níveis de CORT ou de S100B foram obtidos através dos índices de habituação. Estes índices foram calculados pela subtração dos valores adquiridos no dia de teste pelos valores adquiridos no dia de treinamento (BOLIVAR, 2009). A fim de evitar inflações de erros do tipo I, os únicos analitos utilizados nas regressões lineares foram a CORT (sérica) e a S100B (do CSF).

Na Figura 10A podemos observar que tanto a concentração relativa de CORT, no soro, e S100B, no CSF, não se correlacionam com a habituação da distância total viajada (CORT, $R = 0,095$, $P = 0,551$; S100B, $R = 0,202$, $P = 0,295$). Em contrapartida, os níveis séricos relativos de CORT apresentaram uma correlação negativa com a familiarização do tempo despendido no centro do aparato, e uma correlação positiva com a habituação do tempo despendido nas zonas laterais ($R = - 0,439$, $P = 0,0051$; $R = 0,439$, $P = 0,0051$, respectivamente), como observado nas Figuras 10B e 10C. Tal comportamento não foi observado para os níveis de S100B no CSF (tempo no centro: $R = 0,212$, $P = 0,271$; tempo nas laterais: $R = - 0,212$, $P = 0,271$). Correlações com os índices de habituação para o tempo e para o número de episódios de *freezing* não mostraram significância estatística tanto para a CORT como para a S100B (dados não mostrados).

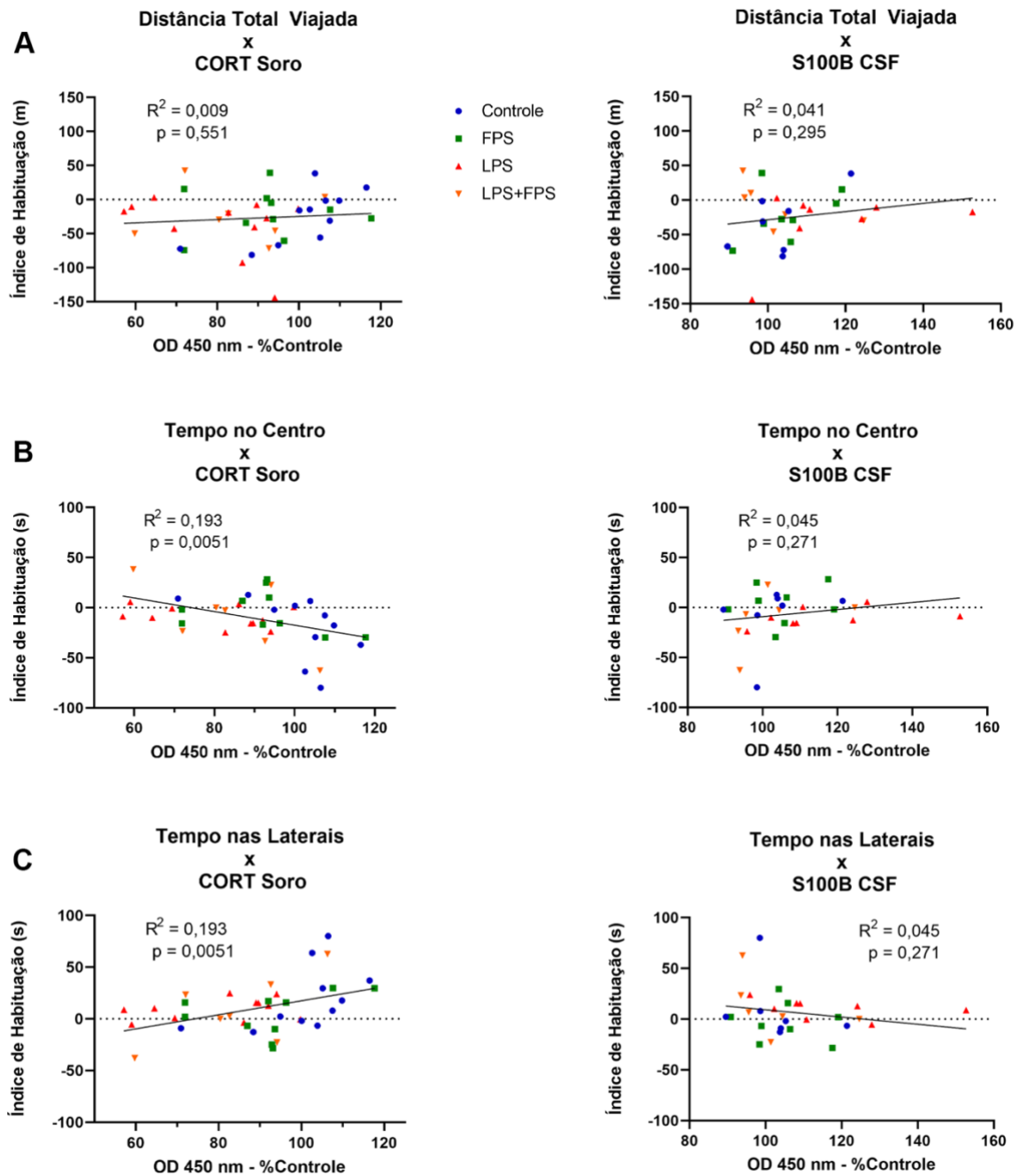


Figura 10: Regressões lineares – OFT v. CORT/S100B. Nos dias 88 e 89 após a injeção de LPS (2 mg/kg i.p.) – 6 e 7 dias após o término do tratamento com FPS-ZM1 (1,2 mg, i.n.) –, os animais foram submetidos ao OFT. 90 dias após a injeção de LPS, todos os animais foram eutanasiados, tendo o soro e o CSF coletados para análises por ELISAs indiretos semi-quantitativos. (A) correlação entre o índice de habituação da distância total viajada com os níveis de CORT no soro (esquerda) e os de S100B no CSF (direita); (B) correlação entre o índice de habituação do tempo no centro do aparato com os níveis de CORT no soro (esquerda) e os de S100B no CSF (direita); e (C) correlação entre o índice de habituação do tempo nas laterais do aparato com os níveis de CORT no soro (esquerda) e os de S100B no CSF (direita). Os índices de habituação foram calculados pela subtração dos valores obtidos no dia de teste pelos valores do dia de treinamento.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós investigamos os efeitos da inibição farmacológica de RAGE no SNC através do tratamento intranasal com seu antagonista, FPS-ZM1, em um modelo animal de neuroinflamação crônica, induzida por uma injeção intraperitoneal única de LPS. Pesos, parâmetros locomotores e cognitivos-comportamentais, perfis inflamatórios e oxidativos do soro e CSF, além da análise dos níveis de RAGE e seus ligantes (também no soro e CSF), foram acessados neste estudo.

Nossos resultados indicam uma redução da concentração de CORT no soro dos animais injetados com LPS, tratados ou não com o inibidor de RAGE. Estudos anteriores demonstraram que a endotoxemia promovida pela administração intraperitoneal de LPS é capaz de danificar as glândulas suprarrenais, reproduzindo um quadro de insuficiência adrenal (KANCZKOWSKI et al., 2013a), sendo este caracterizado pela baixa responsividade a hormônios que regulam a produção de glicocorticoides, acompanhada ou não da redução dos níveis destes últimos (NEARY; NIEMAN, 2010; TSAI et al., 2006). O dano promovido pelo LPS, a nível de células adrenais, ocorre em períodos inferiores a 3 horas após sua administração intraperitoneal, provocando não só uma disfunção mitocondrial e celular, como também gerando um quadro inflamatório local, podendo dificultar ou até mesmo inviabilizar a produção de hormônios (DUAN et al., 2016; KANCZKOWSKI et al., 2013b; WANG et al., 2014, 2015). Assim, a diminuição dos níveis de CORT observada nos animais injetados com LPS pode estar relacionada a danos diretos nas glândulas suprarrenais, independentemente do controle da concentração deste hormônio pelo eixo HPA – onde a inibição encefálica de RAGE (através do tratamento intranasal com FPS-ZM1) poderia estar agindo de forma mais eminente, regulando a inflamação em regiões cerebrais relacionadas ao balanço deste eixo. Não somente, para reforçar esta hipótese, já foi constatado que as glândulas adrenais possuem um lento grau de renovação celular, o que contribui para que um dano agudo possa se manter durante semanas (CHANG et al., 2013).

Outra importante característica da insuficiência adrenal é a perda de peso (MARTIN-GRACE et al., 2020). Nosso estudo revelou uma diminuição do ganho de peso progressivo esperado dos animais, quando estes são sujeitados ao LPS, sendo independente do tratamento com FPS-ZM1. Evidentemente, diversos fatores estão relacionados ao ganho ou à perda de massa corpórea, porém, considerando o relevante papel dos hormônios corticoides, principalmente o cortisol, em humanos, e a CORT, em ratos, no metabolismo de glicose, majoritariamente na estimulação de vias gliconeogênicas, a perda de peso acaba podendo se

tornar uma consequência da alteração dos níveis destes. Não somente, recentemente, a regulação da fome foi demonstrada ser altamente dependente do eixo HPA, onde a CORT é capaz de estimular diretamente neurônios relacionados à incitação da fome (PERRY et al., 2019).

A ausência de alteração dos níveis séricos de mediadores inflamatórios, excluindo a CORT, já era esperada. O modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS leva apenas a um aumento transitório e agudo de mediadores inflamatórios e oxidativos no soro/plasma (CAVAILLON, 2018; DICKSON; LEHMANN, 2019; QIN et al., 2007; SOMANN et al., 2019), característico de uma endotoxemia. O presente modelo empregado, analisando os animais 90 dias após a injeção de LPS, não é capaz de detectar tais alterações. Assim, mesmo que haja a participação da regulação da inflamação periférica pelo SNC, uma vez que esta não esteja presente, os efeitos da inibição de RAGE, a nível de SNC, acabam não sendo vistos a nível sistêmico.

Por outro lado, a neuroinflamação associada ao modelo de endotoxemia induzida por LPS já foi mostrada persistir por até 10 meses após a administração do composto (QIN et al., 2007). No nosso trabalho, a avaliação neuroinflamatória se deu somente no CSF dos animais, trazendo apenas um panorama geral de como o SNC pode estar se comportando frente ao insulto por LPS. Em doenças que possuem como característica a neuroinflamação, a alteração dos níveis de mediadores inflamatórios no CSF variam muito de condição a condição (LEPENNETIER et al., 2019). No presente estudo, o LPS levou a um aumento somente dos níveis relativos de S100B, sendo este revertido pelo tratamento intranasal com FPS-ZM1. A S100B é uma proteína ligante de RAGE, secretada predominantemente por astrócitos, que muitas vezes reflete os estados de ativação pró-inflamatórios deste tipo celular (SEN; BELLI, 2007). Todavia, quando em baixas concentrações, esta proteína pode exercer funções neurotróficas e neuroprotetoras (ANGELOPOULOU; PAUDEL; PIPERI, 2021). Em um estudo publicado em 2011, os autores detectaram uma elevação dos níveis de S100B no CSF de ratos injetados intracerebroventricularmente com LPS, em períodos de inflamação aguda (dentro de 24h), correlacionando-se positivamente com estados de ativação astrocitária (GUERRA et al., 2011). Desta forma, e considerando sua alteração no CSF em outras condições neuroinflamatórias (MICHETTI et al., 2019; SEN; BELLI, 2007), podemos sugerir que os elevados níveis de S100B, encontrados na nossa investigação, estejam relacionados a um quadro de ativação neuroimune, ainda que este não aponte alterações de outros mediadores inflamatórios no CSF. Consequentemente, indicamos o potencial anti-inflamatório da inibição

de RAGE no SNC, pelo resgate dos níveis de S100B a níveis de controles nos grupos tratados com FPS-ZM1.

Os níveis de RAGE e de vários de seus ligantes já foram encontrados alterados no CSF e no soro de pacientes de diferentes doenças neurodegenerativas (GLASNOVIĆ et al., 2014; LI et al., 2010; SOKÓŁ et al., 2017; WANG et al., 2017, 2016; YAMAGISHI et al., 2005). Porém, com exceção da S100B, os níveis de nenhum outro ligante foram encontrados alterados neste estudo, possivelmente indicando que os animais não tenham sofrido danos suficientes para serem detectados em tais fluidos, considerando que, no SNC, injúrias mais grosseiras ocorrem somente por volta dos 7 meses após a injeção intraperitoneal de LPS, marcadas principalmente pela morte neuronal (QIN et al., 2007; TU et al., 2019) – ou ainda que o dano tenha se estendido somente a tecidos nervosos.

Em condições de inflamação aguda (e.g. períodos inferiores a 24 horas após um insulto sistêmico), encontramos, no CSF de animais, alterados níveis de diversos mediadores, tanto pró como anti-inflamatórios (GARNER et al., 2018; LIU et al., 2020b; MUK et al., 2019; VENTORP et al., 2017; YAMASHIRO; DE SOUZA; DE MELO SOARES, 2019), e estes tendem a retornar à normalidade a medida que a condição passa a ser crônica. Todavia, em longo prazo, alguns marcadores voltam a se tornar alterados. Para modelos animais de sepse e/ou de LPS, já foi demonstrado que em algumas semanas após o desafio, os níveis de TNF- α e de IL-6 voltam a se elevar (FLORENTINO et al., 2020; STECKERT et al., 2013). Por mais que não tenhamos visto uma diferença estatística nos níveis destes dois marcadores, uma tendência ao aumento de TNF- α foi observada apenas no grupo LPS (teste *post hoc* de Dunnet, $P = 0,095$; em relação ao grupo Controle, Figura 7A), possivelmente indicando um comportamento semelhante ao observado nos estudos anteriores, tendo a inibição de RAGE pelo tratamento intranasal com FPS-ZM1 como um fator neuroprotetor, visto que esta tendência não foi observada no grupo tratado com o composto.

O protocolo de OFT utilizado neste estudo é capaz de detectar alterações nos padrões de habituação dos animais, ao comparar diferentes parâmetros em dois dias consecutivos (POVEDA et al., 2020). Devido ao comportamento exploratório natural dos roedores, uma diminuição do grau de exploração do aparato é esperada em animais saudáveis, aumentando o tempo de imobilidade e diminuindo a distância total viajada (habituação “tradicional”), em dia posterior ao de treinamento (BOLIVAR, 2009). Nossos resultados mostram uma diminuição, apenas nos animais injetados com LPS, da distância total viajada e do tempo despendido no centro da arena, acompanhados de um aumento do número de episódios e do tempo total de *freezing*, além de um maior tempo nas zonas laterais, sempre em relação ao dia de treinamento.

Em uma primeira instância, estes resultados parecem indicar que apenas os animais tratados com LPS foram capazes de se familiarizar ao teste. Porém, a habituação observada em avaliações comportamentais pode variar muito com a linhagem dos ratos. Estudos anteriores mostram que, dependendo desta, animais saudáveis podem ou não se mostrar classicamente habituados ao teste (BOLIVAR, 2009; DISHMAN et al., 1988; PERTSOV et al., 2009). Desta forma, é coerente assumir que a alteração do grau de habituação do grupo LPS em relação ao Controle possa estar indicando tanto um déficit cognitivo-comportamental, como um déficit motor, sendo este revertido pela inibição de RAGE no SNC.

Por ter sido detectada uma diferença em medida locomotora (acessada pela distância total viajada), a interpretação de indicadores de performance cognitiva-comportamental (*freezing* e tempos em diferentes zonas) é dificultada, visto que um fator pode interferir na análise do outro. Em roedores, alterados níveis de CORT estão fortemente relacionados a parâmetros comportamentais (SHIEH; YANG, 2018; SINGLETON; GARLAND, 2019). Neste trabalho, os níveis relativos de CORT se correlacionam com o tempo gasto nas zonas laterais e centrais. Já foi demonstrado que baixos níveis de CORT se relacionam com comportamentos do tipo-depressivo, sendo estes independentes de déficits locomotores (MIZOGUCHI et al., 2008), permitindo-nos assumir que estas deficiências locomotoras observadas no grupo LPS possam ter surgido como uma consequência de um comportamento do tipo-depressivo ou ansioso.

Não obstante, comparados aos animais injetados apenas com LPS, vemos que a administração intranasal de FPS-ZM1 não resgata os níveis séricos de CORT a nível de controles, porém, o comportamento do tipo-depressivo/ansioso parece ser revertido. Aqui surge uma aparente divergência: ao passo que a CORT se correlaciona com o perfil cognitivo-comportamental, o resgate deste independe da normalização dos níveis de CORT. Todavia, a atuação da CORT no SNC depende de diversos outros fatores além de sua concentração periférica, como níveis de neurotransmissores, ativação de vias de neurotransmissão e até mesmo do status neuroinflamatório (CADOR; DULLUC; MORMÉDE, 1993; PIAZZA et al., 1996; SHOAI; SHIPPENBERG, 1996; STRUNTZ; SIEGEL, 2018). Assim, considerando o papel do RAGE em todos esses, a inibição deste no SNC pela administração intranasal de FPS-ZM1 pode estar levando à alteração comportamental observada de forma independente dos níveis sistêmicos de CORT.

Este estudo se limita a análises mais gerais do panorama inflamatório dos animais. A falta de investigação das glândulas adrenais para a confirmação de um quadro de insuficiência adrenal, assim como a ausência de outros testes comportamentais para uma melhor

determinação de déficits locomotores/cognitivos-comportamentais, acabam atendo os resultados obtidos a especulações baseadas em dados da literatura. Não somente, o acesso da neuroinflamação pela elaboração de perfis inflamatórios no CSF é limitado, ao contrário de análises dos níveis de ativação astrocitária e microglial em diferentes regiões cerebrais, que acabaram não sendo realizada neste estudo. Por este ter sido o primeiro trabalho descrevendo a administração intranasal de FPS-ZM1, a confecção de curvas de biodistribuição do composto em diferentes áreas do SNC, assim como em tecidos periféricos, poderia ser utilizada para verificar se a inibição de RAGE está ocorrendo, de fato, somente em regiões encefálicas. Além da confecção destas, outras formas de inibição de RAGE, que não farmacológicas, como por siRNAs, poderiam reforçar a participação deste receptor nos processos neuroinflamatórios destacados nesta investigação.

6 CONCLUSÃO

Em suma, este trabalho mostra que a inibição encefálica RAGE pelo seu antagonista farmacológico FPS-ZM1 (através de vias intranasais de administração), em um modelo animal de neuroinflamação induzida pela administração intraperitoneal de LPS (2 mg/kg, i.p.), reverte comportamentos do tipo-depressivo/ansioso e resgata os elevados níveis de S100B no CSF, ambos promovidos pelo modelo. Em contrapartida, o tratamento intranasal com este inibidor falha em reverter os alterados níveis séricos de CORT e a tendência a diminuir o ganho de peso esperado dos animais sujeitos ao modelo. Assim, indicamos a relevância do RAGE na mediação de processos neuroinflamatórios crônicos, e a independência destes na modulação de determinados fenômenos sistêmicos. Futuramente, investigações do grau de ativação glial, assim como determinações dos níveis de RAGE e de seus ligantes em diferentes regiões do encéfalo, bem como estudos de biodistribuição do fármaco em variadas áreas do cérebro serão realizados para melhor interpretação dos resultados obtidos neste trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 11, n. 3, p. 332–384, mar. 2015.
- ANGELOPOULOU, E.; PAUDEL, Y. N.; PIPERI, C. Emerging role of S100B protein implication in Parkinson's disease pathogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1445–1453, fev. 2021.
- BATISTA, C. R. A. et al. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 9 maio 2019.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64–102, fev. 1996.
- BOLIVAR, V. J. Intrasection and interseccion habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 2, p. 206–214, set. 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BROWN, G. C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, 13 set. 2019.
- CADOR, M.; DULLUC, J.; MORMÉDE, P. Modulation of the locomotor response to amphetamine by corticosterone. **Neuroscience**, v. 56, n. 4, p. 981–988, out. 1993.
- CAVAILLON, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 149, p. 45–53, jul. 2018.
- CHANG, S.-P. et al. Cell Proliferation, Movement and Differentiation during Maintenance of the Adult Mouse Adrenal Cortex. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 4 dez. 2013.
- CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259–284, 2005.
- CHROUSOS, G. P.; ZAPANTI, E. D. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in HIV infection and disease. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 791–806, set. 2014.
- CROWE, T. P. et al. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences**, v. 195, p. 44–52, 15 fev. 2018.
- CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 71–90, jan. 2013.
- DEANE, R. et al. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1377–1392, abr. 2012.
- DICKSON, K.; LEHMANN, C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4341, 5 set. 2019.
- DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139 Suppl 2, p. 136–153, out. 2016.
- DISHMAN, R. K. et al. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiology & Behavior**, v. 43, n. 5, p. 541–546, 1988.
- DUAN, G.-L. et al. Resveratrol alleviates endotoxemia-associated adrenal insufficiency by suppressing oxidative/nitrative stress. **Endocrine Journal**, v. 63, n. 6, p. 569–580, 2016.

- E, B. et al. High levels of cerebrospinal fluid chemokines point to the presence of neuroinflammation in peripheral neuropathic pain: a cross-sectional study of 2 cohorts of patients compared with healthy controls. **Pain**, v. 158, n. 12, dez. 2017.
- ERDŐ, F. et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, 1 out. 2018.
- FLORENTINO, D. et al. Early life neuroimmune challenge protects the brain after sepsis in adult rats. **Neurochemistry International**, v. 135, p. 104712, 1 maio 2020.
- FREISE, H.; BRÜCKNER, U. B.; SPIEGEL, H. U. Animal Models of Sepsis. **Journal of Investigative Surgery**, v. 14, n. 4, p. 195–212, jan. 2001.
- GARNER, K. M. et al. Microglia priming by interleukin-6 signaling is enhanced in aged mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 324, p. 90–99, nov. 2018.
- GASPAROTTO, J. et al. Targeted inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic denervation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8795, 18 ago. 2017.
- GASPAROTTO, J. et al. Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid- β accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 1, p. 226–244, 5 jan. 2018.
- GHERSI-EGEA, J.-F. et al. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. **Acta Neuropathologica**, v. 135, n. 3, p. 337–361, mar. 2018.
- GLASNOVIĆ, A. et al. Decreased level of sRAGE in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients at clinical onset. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 5, p. 226–233, 2014.
- GUERRA, M. et al. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 128, 2011.
- HERRERO, M.-T. et al. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, p. 32, 2015.
- HOLSBOER, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, nov. 2000.
- HONG, Y. et al. Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid- β Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 5, p. 1192–1199, maio 2016.
- HOOGLAND, I. C. M. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 114, 6 jun. 2015.
- JURANEK, J. et al. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases. **Reviews in the Neurosciences**, v. 26, n. 6, p. 691–698, 2015.
- KANCZKOWSKI, W. et al. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 371, n. 1–2, p. 228–235, maio 2013a.
- KANCZKOWSKI, W. et al. Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 36, p. 14801–14806, 3 set. 2013b.
- LEPENNETIER, G. et al. Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 219, 14 nov. 2019.
- LI, K. et al. Association between the RAGE G82S polymorphism and Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 117, n. 1, p. 97–104, jan. 2010.

- LI, Y. et al. An applicable method of drawing cerebrospinal fluid in rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 74, p. 18–20, 1 jul. 2016.
- LIU, Y. et al. Active smoking, sleep quality and cerebrospinal fluid biomarkers of neuroinflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 89, p. 623–627, out. 2020a.
- LIU, Z. et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 90, 20 mar. 2020b.
- MARTIN-GRACE, J. et al. Adrenal insufficiency: Physiology, clinical presentation and diagnostic challenges. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 505, p. 78–91, jun. 2020.
- MCQUADE, R.; YOUNG, A. H. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 177, p. 390–395, nov. 2000.
- MICHETTI, F. et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 148, n. 2, p. 168–187, jan. 2019.
- MILLER, E. S. et al. Plasma and cerebrospinal fluid inflammatory cytokines in perinatal depression. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 220, n. 3, p. 271.e1-271.e10, mar. 2019.
- MIZOGUCHI, K. et al. Suppression of glucocorticoid secretion induces a behaviorally depressive state in rotarod performance in rat. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 730–734, out. 2008.
- MUK, T. et al. Rapid Proteome Changes in Plasma and Cerebrospinal Fluid Following Bacterial Infection in Preterm Newborn Pigs. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 15 nov. 2019.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition**. [s.l.] National Academies Press, 2010.
- NEARY, N.; NIEMAN, L. Adrenal Insufficiency- etiology, diagnosis and treatment. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 17, n. 3, p. 217–223, jun. 2010.
- NIROGI, R. et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 178, n. 1, p. 116–119, 30 mar. 2009.
- OLSSON, T. et al. Genetic dissection of neurodegeneration and CNS inflammation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 233, n. 1–2, p. 99–108, 15 jun. 2005.
- PANG, Y. et al. Intranasal insulin protects against substantia nigra dopaminergic neuronal loss and alleviates motor deficits induced by 6-OHDA in rats. **Neuroscience**, v. 318, p. 157–165, 24 mar. 2016.
- PERRY, R. J. et al. Leptin's hunger-suppressing effects are mediated by the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rodents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 27, p. 13670–13679, 2 jul. 2019.
- PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, n. 5, p. 407–413, set. 2004.
- PERTSOV, S. S. et al. Effect of interleukin-1beta on the behavior of rats during mild stress in the open-field test. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, n. 5, p. 735–737, nov. 2009.
- PIAZZA, P. V. et al. Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effects on the mesolimbic dopaminergic transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15445–15450, 24 dez. 1996.
- POVEDA, C. M. et al. The diurnal variation of open-field habituation in rats. **Behavioural Processes**, v. 178, p. 104186, 1 set. 2020.

- PRANTNER, D.; NALLAR, S.; VOGEL, S. N. The role of RAGE in host pathology and crosstalk between RAGE and TLR4 in innate immune signal transduction pathways. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 12, p. 15659–15674, 2020.
- QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 453–462, 1 abr. 2007.
- RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6301, p. 777–783, 19 ago. 2016.
- RODRIGUEZ, J. M. et al. Glucocorticoid resistance in chronic diseases. **Steroids**, v. 115, p. 182–192, nov. 2016.
- SCHAAF, M. J. M.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 83, n. 1–5, p. 37–48, dez. 2002.
- SEN, J.; BELLI, A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 7, p. 1373–1380, 15 maio 2007.
- SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **The International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, jul. 2017.
- SHEN, L. et al. FPS-ZM1 Alleviates Neuroinflammation in Focal Cerebral Ischemia Rats via Blocking Ligand/RAGE/DIAPH1 Pathway. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 63–78, 6 jan. 2021.
- SHIEH, K.-R.; YANG, S.-C. Corticosterone level and central dopaminergic activity involved in agile and exploratory behaviours in formosan wood mice (*Apodemus semotus*). **Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 204, n. 6, p. 549–559, jun. 2018.
- SHINDEL, C.; HOLLAND, J. M.; GALLAGHER-THOMPSON, D. The Link between Activities of Daily Living and Cortisol in Late-Life Depression. **Clinical Gerontologist**, v. 43, n. 4, p. 430–440, set. 2020.
- SHOAIB, M.; SHIPPENBERG, T. S. Adrenalectomy attenuates nicotine-induced dopamine release and locomotor activity in rats. **Psychopharmacology**, v. 128, n. 4, p. 343–350, 6 dez. 1996.
- SINGLETON, J. M.; GARLAND, T. Influence of corticosterone on growth, home-cage activity, wheel running, and aerobic capacity in house mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. **Physiology & Behavior**, v. 198, p. 27–41, 1 jan. 2019.
- SOKÓŁ, B. et al. Increase of Soluble RAGE in Cerebrospinal Fluid following Subarachnoid Haemorrhage. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 7931534, 2017.
- SOMANN, J. P. et al. Characterization of plasma cytokine response to intraperitoneally administered LPS & subdiaphragmatic branch vagus nerve stimulation in rat model. **PloS One**, v. 14, n. 3, p. e0214317, 2019.
- STECKERT, A. V. et al. Late brain alterations in sepsis-survivor rats. **Synapse**, v. 67, n. 11, p. 786–793, 2013.
- STRUNTZ, K. H.; SIEGEL, J. A. Effects of methamphetamine exposure on anxiety-like behavior in the open field test, corticosterone, and hippocampal tyrosine hydroxylase in adolescent and adult mice. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 211–218, ago. 2018.
- TEISSIER, T.; BOULANGER, É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. **Biogerontology**, v. 20, n. 3, p. 279–301, jun. 2019.
- TIEFENSEE RIBEIRO, C. et al. Intranasal HSP70 administration protects against dopaminergic denervation and modulates neuroinflammatory response in the 6-OHDA rat model. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 14, p. 100253, 1 jul. 2021.
- TSAI, M.-H. et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 43, n. 4, p. 673–681, abr. 2006.

TU, D. et al. The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 255, 5 dez. 2019.

VENTORP, F. et al. Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, n. 2, p. 263–273, 16 maio 2017.

VON BERNHARDI, R.; EUGENÍN-VON BERNHARDI, L.; EUGENÍN, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 124, 2015.

WANG, C.-N. et al. CBS and CSE are critical for maintenance of mitochondrial function and glucocorticoid production in adrenal cortex. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 16, p. 2192–2207, 1 dez. 2014.

WANG, C.-N. et al. Overproduction of nitric oxide by endothelial cells and macrophages contributes to mitochondrial oxidative stress in adrenocortical cells and adrenal insufficiency during endotoxemia. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 83, p. 31–40, jun. 2015.

WANG, K.-C. et al. Cerebrospinal fluid high mobility group box 1 is associated with neuronal death in subarachnoid hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 37, n. 2, p. 435–443, fev. 2017.

WANG, P. et al. RAGE and AGEs in Mild Cognitive Impairment of Diabetic Patients: A Cross-Sectional Study. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0145521, 2016.

XIE, J. et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cellular Signalling**, v. 25, n. 11, p. 2185–2197, nov. 2013.

YAMAGISHI, S. et al. Serum or cerebrospinal fluid levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) may be a promising biomarker for early detection of Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 6, p. 1205–1207, 2005.

YAMASHIRO, L. H.; DE SOUZA, G. E. P.; DE MELO SOARES, D. Role of CINC-1 and CXCR2 receptors on LPS-induced fever in rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 471, n. 2, p. 301–311, fev. 2019.

ZHOU, H. et al. RAGE antagonism by FPS-ZM1 attenuates postoperative cognitive dysfunction through inhibition of neuroinflammation in mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4187–4194, out. 2017.