EVOLUÇÃO TEMPORAL DA EXPRESSÃO DAS CASPASES E NF-κB EM CAMUNDONGOS COM ISQUEMIA GLOBAL E TRANSITÓRIA

Felipe Bento Michelato (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Gabriella Candido, Jéssica Mendes Bonato, Humberto Milani, Rúbia Maria Weffort de Oliveira (Orientadora). E-mail: rmmwoliveira@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Farmacologia, Neuropsicofarmacologia

Palavras-chave: isquemia cerebral; camundongos; inflamassoma

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a evolução temporal da expressão de marcadores relacionados ao inflamassoma, como as caspases 1 e 3 e o fator nuclear kappa B (NF-κB), em um modelo experimental de isquemia cerebral (IC), a fim de determinar o melhor intervalo pós-isquemia para a intervenção com drogas neuroprotetoras. Para isso, foram coletados tecidos cerebrais de camundongos machos submetidos à isquemia cerebral por meio da oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC) durante 20 minutos. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram distribuídos em grupos experimentais e eutanasiados nos períodos de 3, 24, 48 e 72 horas após a indução da isquemia, para posterior remoção dos tecidos cerebrais. As amostras foram processadas para análise da expressão proteica por meio da técnica de Western blotting. Embora os resultados não tenham apresentado significância estatística, a análise dos gráficos sugere uma possível relação entre a isquemia cerebral e o aumento da expressão das caspases 1 e 3 e do NF-κB, especialmente no período de 24 horas após a indução da IC. Dessa forma, os resultados sugerem que o período de 24 horas pós-isquemia pode ser considerado um intervalo adequado para futuras investigações envolvendo intervenções farmacológicas com drogas neuroprotetoras.

INTRODUÇÃO

A IC é a segunda principal causa de morte e a terceira de incapacidade em adultos (Campbell; Khatri, 2020). A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, desencadeia a "cascata isquêmica", caracterizada por uma série de eventos interligados que contribuem para a ativação do inflamassoma e consequente morte neuronal (Campbell et al., 2019). O inflamassoma da proteína 3 contendo domínio pirina (NLRP3) é um complexo multiproteico intracelular que atua como estrutura essencial para a regulação da imunidade e inflamação. Sua ativação depende do fator de transcrição NF-κB e das caspases (Liu et al., 2017). Esse estudo se propôs a investigar a expressão temporal de proteínas associadas ao complexo do

inflamassoma NLRP3, tais como as caspases e o NF-κB, em camundongos submetidos à IC induzida pela OBACC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos jovens (aproximadamente 30g, 2-3 meses). Os animais permaneceram em condições padrão de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12h), temperatura controlada, água e ração à vontade. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos sob autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da UEM. A isquemia cerebral global e transitória foi induzida por OBACC. Os animais foram submetidos a anestesia com isoflurano/oxigênio e então realizada uma incisão ventral no pescoço para a exposição das artérias carótidas comuns. Em seguida, foi realizada a clipagem das mesmas por 20 minutos. Após esse tempo, os clipes foram removidos, garantindo reperfusão, e a incisão foi suturada. Os animais permaneceram em repouso até tempos determinados para sacrifício e coleta dos tecidos cerebrais, os quais foram adequadamente retirados e armazenados em freezer -80°C até o uso. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em projetos anteriores (CEUA nº 7783160823). Os homogenatos já existentes foram utilizados para realizar as análises bioquímicas necessárias. Estes procedimentos seguem a RN 55-CONCEA, disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-55-de-5-de-outubro-de-2022-434869177.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em grupos experimentais, conforme os tempos de sacrifício após a IC: 3h, 24h, 48h e 72h. Foram constituídos os seguintes grupos experimentais: Sham (falso operado), OBACC 3 horas, OBACC 24 horas, OBACC 48 horas e OBACC 72 horas

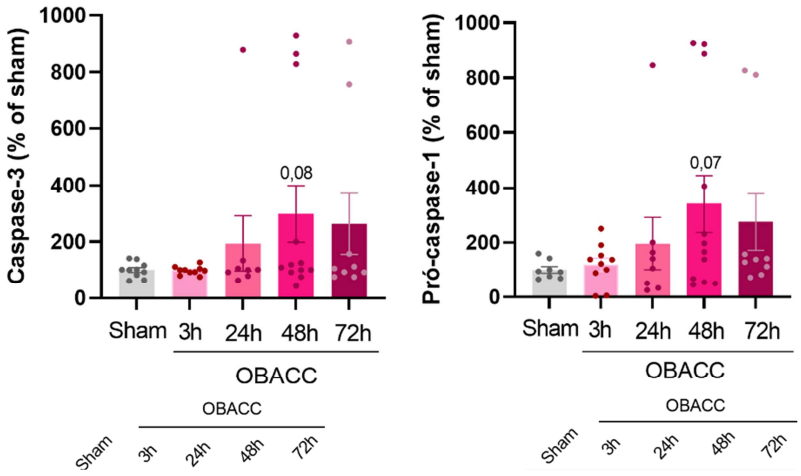
Western blotting

Os hipocampos dos animais foram dissecados e processados para a detecção do NLPR3, pró-caspase 1, caspase 3 e NF-κB por western blotting. As amostras foram lisadas em tampão contendo inibidores de protease e fosfatase e centrifugadas por 10 minutos a 4 ºC e 12.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração total de proteínas pelo método Bio-Rad Lowry Protein Assay. As amostras (30 µg de proteína) foram submetidas à SDS-PAGE a 10%, utilizando oito membranas para a análise das proteínas. Após a transferência para membranas de nitrocelulose, estas foram bloqueadas com leite a 5% em TBS e incubadas com anticorpos primários a 4 ºC durante a noite. Posteriormente, foram incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, e os sinais foram revelados por ECLplus®. As membranas foram submetidas ao stripping para avaliação da proteína

controle GAPDH. As bandas foram visualizadas no sistema ChemiDoc, quantificadas pelo ImageJ e normalizadas pelos níveis de GAPDH. Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prisma, versão 8) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM) por grupo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo teste de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatística para as medidas de caspase-3 (fig. 1A, K = 1,34, p = 0,71), pró-caspase-1 (fig. 1B, K = 2,39, p = 0,49), NF-κB (fig. 1C, K = 2,56, p = 0,46) e NLPR3 (fig. 1D, K = 2,2, p = 0,53). Deve-se ressaltar que houve grande variação na expressão das proteínas analisadas nos grupos experimentais, embora o perfil dos gráficos indique aumento das proteínas avaliadas já após 24h da IC. É fundamental mencionar que devido a um problema de refrigeração do material no freezer e frequentes quedas de energia na UEM, cérebros de animais do grupo sham não foram incluídos nas análises da NLPR3 e NF-κB, o que prejudicou a conclusão final. No entanto, Franke et al. (2021) encontraram aumento de expressão de componentes da via do inflamassoma de NLRP3 no córtex e gânglios basais de camundongos, também 24h após a indução de isquemia focal. Estes achados coincidem com os observados neste estudo. Novos experimentos estão em andamento para a obtenção de resultados mais conclusivos.



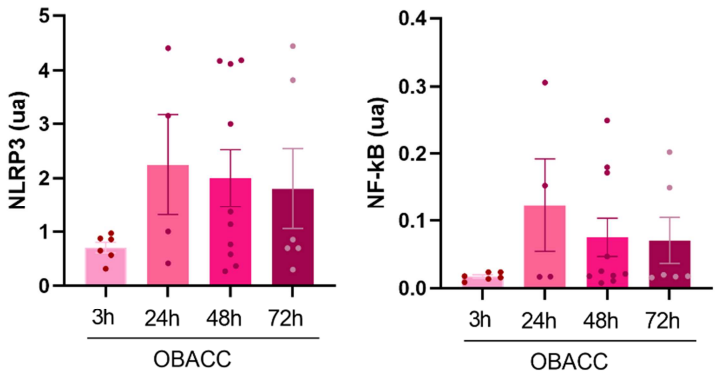


Figura 1 – Gráficos representativos da expressão de proteínas do inflamassoma NLRP3, analisadas pela técnica de Western blotting, incluindo caspase-3, Pró-caspase-1, NLRP3 e NF-κB. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão das médias (EPM).
Oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (OBACC). n = 4-10/grupo.

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a ativação da via do inflamassoma NLRP3 e a expressão das caspases, enzimas envolvidas na morte neuronal pós IC, ocorrem de forma mais expressiva 24h após o insulto isquêmico, indicando um momento crítico para a avaliação de drogas neuroprotetoras. Estudos adicionais sejam necessários para confirmar sua participação e estabelecer sua relação com a morte celular.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo apoio e financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

CAMPBELL, B. C. V.; KHATRI, P. Stroke. **Lancet**, [S. l.], v. 396, n. 10244, p. 129-142, jul. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32653056/. Acesso em: 27 ago. 2026.

CAMPBELL, B. C. V. et al. Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 5, artigo 70, out. 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8. Acesso em: 27 ago. 2026.

FRANKE, M. et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 92, p. 223-233, fev. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.009. Acesso em: 27 ago. 2026.

LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 2, artigo 17023, jul. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23. Acesso em: 27 ago. 2026.