

TRATAMENTO REPETIDO COM O ANOREXÍGENO 4,4'-DICLORODIFENIL DISSELENETO INDUZ TOXICIDADE EM FÍGADO DE RATOS

TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH¹; JÉSSICA IARA GALL²; AMÁLIA GONÇALVES ALVES³; JOSÉ SEBASTIÃO DOS SANTOS NETO⁴; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING⁵; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

^{1,2, 3,4,5,6} Universidade Federal de Pelotas - Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) - taisteixeira.r@gmail.com; je.gall@hotmail.com; amaliaalvs@gmail.com; zeneto.qmc@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br; cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos de selênio (Se) têm sido propostos experimentalmente como potenciais candidatos terapêuticos devido à diversidade de ações biológicas já descritas. No entanto, doses farmacológicas eficazes destes podem estar associadas também a efeitos tóxicos (NOGUEIRA e ROCHA, 2011). O 4,4'-diclorodifenil disseleneto (*p*-CIPhSe)₂ (Fig. 1), tem sido estudado quanto a suas ações antidepressiva, nootrópica (BORTOLATTO et al., 2012), anorexígena (BORTOLATTO et al., 2015ab) e estabilizadora da função metabólica em um modelo de obesidade em ratos (QUINES et al., 2018).

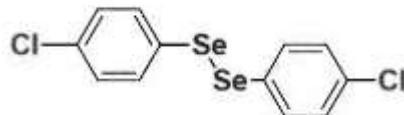


Fig. 1 Estrutura química do composto (*p*-CIPhSe)₂

Estudos comportamentais e moleculares indicam que a ação do tipo anorexígena do (*p*-CIPhSe)₂ se dá, em parte, via modulação do sistema serotoninérgico e de vias hipotalâmicas. Por outro lado, tem-se indícios que o mesmo composto possa induzir efeitos indesejados nos animais (BORTOLATTO et al., 2015ab, 2017). O fígado é responsável por realizar a detoxificação de substâncias estranhas ao organismo (xenobióticos), porém alguns agentes químicos, fármacos e toxinas podem causar toxicidade neste órgão via estresse de retículo endoplasmático (KAUFMAN, 2011). A insuficiência de resposta ao estresse pode levar a ativação de vias de inflamação e posterior apoptose, causando doenças hepáticas devido ao mal dobramento de proteínas (DARA e KAPLOWITZ, 2011). Um exemplo desta condição é observado para a sertralina, um antidepressivo que provoca hepatotoxicidade possivelmente relacionada ao estresse de retículo endoplasmático nestas células (FOUFELLE et al., 2015).

Dados ainda não publicados revelaram que o tratamento por 7 dias com o anorexígeno (*p*-CIPhSe)₂ causa efeitos adversos no organismo do roedor, pois induz estresse de retículo endoplasmático no tecido hepático. Baseado nisso, o objetivo do presente trabalho foi investigar se o tratamento repetido com (*p*-CIPhSe)₂ poderia, subsequentemente, ativar vias envolvidas em eventos de estresse e morte celular.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos machos adultos da espécie Sprague Dawley (200-280g) (Aprovação do Comitê de ética: 050/2012). O composto (*p*-CIPhSe)₂ foi preparado e caracterizado com base no estudo de PAULMIER (1986) no

Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação farmacológica e Toxicológica de Compostos Organocalcogênios (LASRAFTO) e dissolvido em óleo mineral.

Os animais foram divididos em dois grupos ($n=8$ ratos/grupo). O (p -CIPhSe)₂ foi administrado na dose de 10 mg/kg pela via intraperitoneal (i.p.) por 7 dias consecutivos. O grupo controle recebeu apenas o veículo (óleo mineral, 1ml/kg) durante o mesmo período. Os animais foram pesados no primeiro e no último dia de teste. Duas horas após a última administração, os animais foram mortos e o fígado foi removido e preparado para os ensaios.

Para a análise de proteínas no tecido hepático ($n=7$ amostras/grupo), utilizou-se uma alíquota do lisado total de tecido hepático (20 µg proteína), a qual foi submetida ao ensaio de Western Blotting (IMBERNON et al., 2013). Análises quantitativas foram realizadas utilizando os seguintes anticorpos: NF κ B p65 (NF κ B), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (p-JNK), Akt, phospho-Akt (Ser473) (p-Akt), p53, Caspase-3, Caspase-7, Cleaved Caspase-7 (Asp198) (CC7). Os níveis de proteínas foram normalizados para β -actina ou HSP90.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e analisados pelo GraphPad Prism (versão 5). Os grupos foram comparados estatisticamente usando teste t não pareado ou pareado (dados paramétricos). Valores de $p<0.05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal dos animais ao início e fim do experimento está demonstrado na fig. 2.

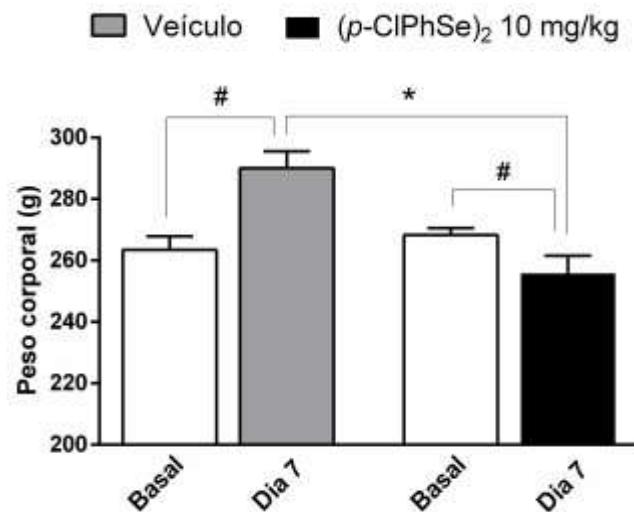


Fig. 2 Efeito do tratamento repetido com (p -CIPhSe)₂ (10 mg/kg, i.p.) sobre o peso corporal de ratos. # $p<0.05$ comparado ao respectivo basal (teste t-pareado); * $p<0.05$ comparado ao veículo (teste t não-pareado).

A partir da avaliação do peso corporal, foi possível observar que os animais que receberam apenas o veículo tiveram um ganho de peso estatisticamente significativo em relação a medida basal ($p<0,0001$), enquanto que os ratos tratados repetidamente com o (p -CIPhSe)₂ apresentaram perda da massa corporal ($p=0,0291$). A comparação direta entre os dois grupos experimentais ao 7º dia de experimento revelou que, de fato, animais que receberam este composto organosselênio apresentaram peso corporal bastante inferior daqueles tratados com o óleo mineral ($p<0,0001$). Estes resultados corroboram com dados anteriores, e reforçam o potencial redutor de peso corporal do anorexígeno (p -CIPhSe)₂.

A Fig. 3 mostra o efeito do tratamento por 7 dias com $(p\text{-ClPhSe})_2$ sobre os níveis de NF- κ B, relação p-JNK/JNK e p-Akt/Akt bem como sobre os níveis de p53 em fígado de ratos.

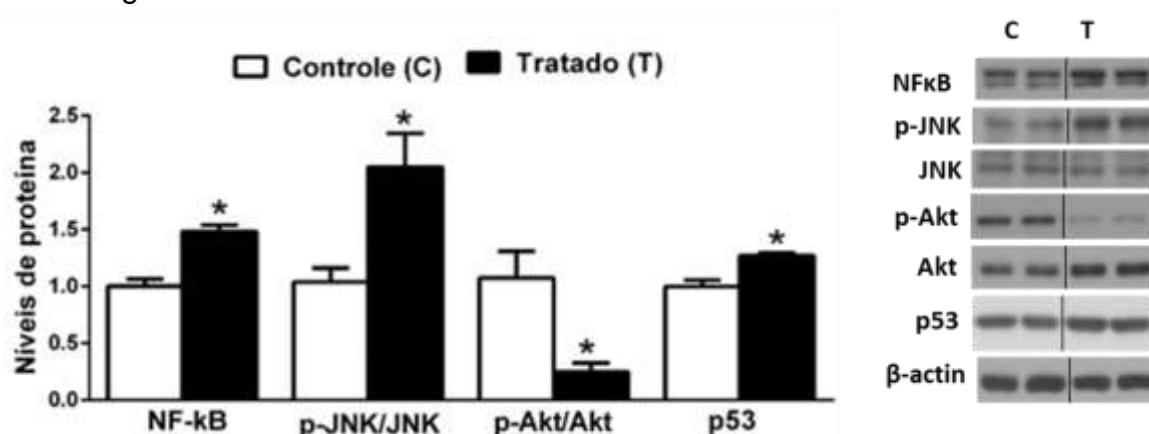


Fig. 3 Efeito do tratamento repetido com $(p\text{-ClPhSe})_2$ (10 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de proteínas hepáticas NF- κ B, relação p-JNK/JNK, relação p-Akt/Akt e p53. * $p<0.05$ comparado ao veículo (teste t não-pareado). NF- κ B: fator nuclear kappa B; JNK: Proteína quinase c-Jun N-terminal; Akt: proteína quinase B.

A análise estatística dos dados revelou que o tratamento com $(p\text{-ClPhSe})_2$ causou um aumento dos níveis hepáticos do NF- κ B ($p=0,0006$), fator de transcrição que é ativado em resposta à sobrecarga do retículo endoplasmático, estresse celular e eventos inflamatórios. O estresse de retículo endoplasmático é capaz de induzir apoptose via proteínas quinases ativadas por estresse tais como a JNK. Neste sentido, os resultados demonstraram que ratos expostos ao $(p\text{-ClPhSe})_2$ apresentaram um aumento da relação p-JNK/JNK ($p=0,0003$) em resposta à presença deste xenobiótico.

Por outro lado, Akt desempenha um papel em prevenir a apoptose. Os dados revelaram uma redução da relação p-Akt/Akt ($p=0,0029$) no fígado de animais que receberam o composto, apontando supressão de vias de sobrevivência celular. Além disso, animais tratados com $(p\text{-ClPhSe})_2$ tiveram um aumento na expressão da proteína p53 ($p=0,0004$), um fator de transcrição nuclear que regula uma ampla variedade de genes envolvidos na apoptose e senescência em resposta a estresse celular ou genotóxico.

A quantificação de caspases, proteínas relacionadas à apoptose, em animais expostos ao $(p\text{-ClPhSe})_2$ está ilustrada na fig. 4.

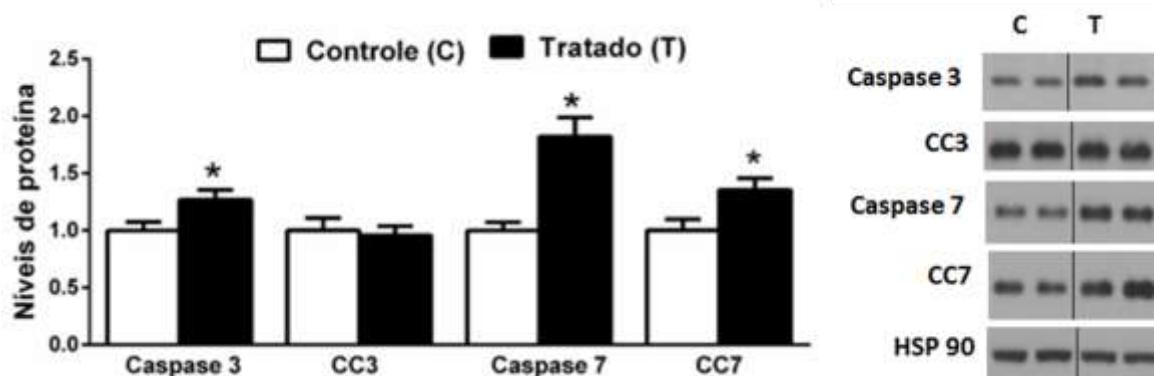


Fig. 4 Efeito do tratamento repetido com $(p\text{-ClPhSe})_2$ (10 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de proteínas hepáticas caspase 3, CC3, caspase 7 e CC7. * $p<0.05$ comparado ao veículo (teste t não-pareado). CC=caspase clivada

A avaliação do conteúdo de caspases revelou um aumento dos níveis proteicos de caspase 3 ($p=0,0185$), caspase 7 ($p=0,0004$) e caspase 7 clivada (CC7) ($p=0,0150$) (Fig. 4), sugerindo que o tratamento com o $(p\text{-ClPhSe})_2$ é capaz de ativar a via de morte celular por apoptose no fígado de ratos. Não houve modificações no conteúdo de CC3 ($p=0,4024$).

Em conjunto, estes resultados indicam o aparecimento de potencial toxicidade hepática em animais tratados com $(p\text{-ClPhSe})_2$.

4. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que a administração repetida de $(p\text{-ClPhSe})_2$ em ratos induziu toxicidade hepática. Esta foi evidenciada pela modulação de proteínas relacionadas à inflamação, estresse e sobrevivência celular que, por fim, culminou na expressão aumentada de caspases, apontando para a ativação das vias de morte celular por apoptose.

Portanto, o efeito redutor do peso corporal do anorexígeno $(p\text{-ClPhSe})_2$ é acompanhado pelo surgimento efeitos adversos importantes, o que sugere precaução em seu uso como um futuro fármaco antiobesidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NOGUEIRA CW, ROCHA JB. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, vol. 85, p. 1313-1359, 2011.
- BORTOLATTO, C.F.; WILHELM, E.A.; CHAGAS, P.M.; et al. p-Chloro-diphenyl diselenide, an organoselenium compound, with antidepressant-like and memory enhancer actions in aging male rats. **Biogerontology**, Santa Maria, 237-49, 2012.
- BORTOLATTO, C. F.; HECK, S. O.; GAI, B. M., ZBOROWSKI, V. A.; NETO, J. S. S.; NOGUEIRA, C. W. Effects of diphenyl and p-chloro-diphenyl diselenides on feeding behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 232, p.2239–2249, 2015a.
- BORTOLATTO CF, HECK SO, ZBOROWSKI VA, GAI BM, NETO JS, NOGUEIRA CW. Evidence for the contribution of multiple mechanisms in the feeding pattern of rats exposed to p-chloro-diphenyl diselenide-supplemented diets. **Physiology & Behavior**, v.151, p.298-307, 2015b.
- BORTOLATTO CF, NOGUEIRA CW, PORTEIRO B, IMBERNÓN M, NOGUEIRAS R. Hypothalamic pathways regulate the anorectic action of p-chloro-diphenyl diselenide in rats. **European Journal of Pharmacology**, vol. 815, p.241-250, 2017.
- KAUFMAN, R. J.; MALHI, H. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. **Journal of hepatology**, Michigan, 795-809, 2011.
- DARA L, JI C, KAPLOWITZ N. The contribution of ER stress to liver diseases. **Hepatology** (Baltimore, Md), vol. 53, p. 1752-1763, 2011.
- FOUFELLE, F.; FROMENTY, B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced. **Pharmacology research & perspectives**, França, 2011.
- PAULMIER C. Selenoorganic functional groups. 1 ed. Oxford: Pergamon Press; 1986.
- IMBERNOM M. B. D.; VAZQUEZ M. J.; MORGAN D.A.; et al. Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. **Gastroenterology**, 636-649, 2013.