

QUERCETINA PREVINE DEFICITS DE INTERAÇÃO SOCIAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO PRÉ-NATAL DE AUTISMO

BRUNA DA SILVERA DE MATTOS¹, LUIZA SPOHR²; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES³; NATHALIA STARK PEDRA⁴; ANITA ALMEIDA ÁVILA⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – bruna.mtt@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – luizaspohr@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – mspereirasoares@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – nathaliastark@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – anita_a_avila@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O autismo é uma neuropatologia caracterizada pelo comprometimento em diversos domínios comportamentais como interação social, linguagem e presença de movimentos repetitivos/estereotipados (RUBENSTEIN et al., 2018). Fatores ambientais e genéticos estão associados com o surgimento do autismo, sendo que a exposição pré-natal a agentes químicos como o ácido valpróico (VPA), vem sendo utilizado como indutor de autismo em modelos experimentais (ZUCKER, 2017). Algumas hipóteses sugerem que o estresse oxidativo, está intimamente relacionado às complicações associadas com o autismo (FRUSTACI et al., 2012).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio do sistema redox, à favor dos oxidantes contra uma depleção dos antioxidantes (SIES, 2015). Espécies reativas ou radicais livres são oxidantes formados em condições normais no organismo, porém quando em excesso, promovem danos à biomoléculas acarretando em disfunção celular (BJORKLUND et al., 2017). Os seres vivos possuem antioxidantes enzimáticos como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutational peroxidase (GPx) e glutational-S-transferase (GST), bem como, antioxidantes não-enzimáticos como vitaminas C e E, e obtém outros da dieta, como compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides (HALLIWELL, 2012).

Considerando que o estresse oxidativo está envolto na patogênese do autismo, o tratamento com antioxidantes pode ser uma nova abordagem terapêutica promissora para esta patologia. A quercetina é um composto fenólico encontrado em diversos alimentos como maçã, cebola, uva, cereja, frutas cítricas, brócolis, etc (KASHYAP et al., 2016). Esta substância possui diversas propriedades terapêuticas, como atividade antioxidante e neuroprotetora (CHEN et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento com quercetina sobre a interação social e em parâmetros de estresse oxidativo em hipocampo de ratos submetidos ao modelo pré-natal de autismo induzido por VPA.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Para a obtenção dos filhotes foram utilizados casais de ratos *Wistar* adultos (60 dias), obtidas do Biotério da UFPEL os quais foram mantidos em ambiente com temperatura (20 - 24°C) e umidade (40 - 60%) controladas, água e alimento ad

libitum, e ciclo claro/escuro de 12 horas. O protocolo experimental desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEa/UFPel 4961-2016).

2.2 Modelo experimental de autismo e tratamento

O composto fenólico quercetina foi obtido da Sigma-Aldrich, sendo Tween 3% utilizado como veículo para a solubilização, enquanto que o VPA foi obtido na forma comercial e solubilizado em salina. As fêmeas foram divididas em quatro grupos ($n=3$): I - controle, II - quercetina, III - VPA e IV - VPA + quercetina. Após a comprovação do estado de prenhes, as fêmeas foram tratadas do 6º ao 18º dia gestacional de acordo com os grupos, I e III receberam veículo e II e IV quercetina 50 mg/kg por via intragástrica. Para a indução do modelo de autismo, no 12º dia gestacional as fêmeas dos grupos III e IV receberam uma única dose de VPA 800 mg/kg por via intragástrica, enquanto que as fêmeas dos grupos I e II receberam veículo. Após o nascimento das ninhadas, no trigésimo quinto dia de vida os filhotes foram avaliados no teste de interação social.

2.3 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

No quadragésimo dia de idade, os filhotes foram submetidos à eutanásia, o cérebro foi coletado e dissecado para obtenção do hipocampo. O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 140 mM de KCl (pH 7,4), centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de peroxidação lipídica, o conteúdo tiólico total (SH) e a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GST. O nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliado segundo o método de Esterbauer & Cheeseman (1990) o qual mede a formação de malondialdeído. O conteúdo tiólico total foi determinado pelo método de Aksenov e Markesbery (2001), que baseia-se na redução do ácido 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) por tióis resultando num derivado amarelo (TNB). A atividade da enzima GPx foi realizada utilizando um kit comercial (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, UK) e a reação monitorada em 340nm de absorbância. A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974) o qual baseia-se na conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em meio reacional contendo glutatona, sendo a atividade da enzima mensurada em 340 nm de absorbância.

2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (two-way ANOVA), seguida do teste de post-hoc de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0.05$ sendo expressos como média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os animais expostos no período pré-natal ao VPA obtiveram redução do tempo de interação social, enquanto que o tratamento com quercetina foi capaz de prevenir esta alteração (Figura 1). Quanto aos indicadores de estresse oxidativo foi observado um aumento dos níveis de peroxidação lipídica nos animais submetidos ao modelo de autismo, enquanto que a quercetina conseguiu prevenir este efeito (Figura 2A).

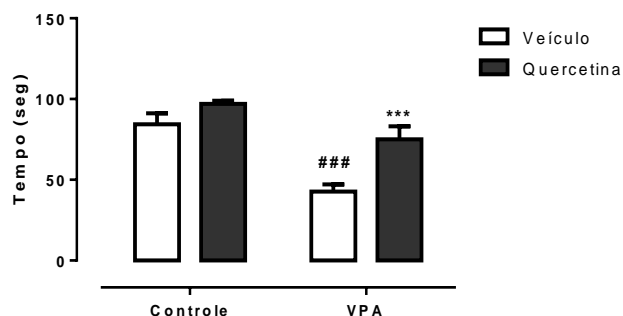


Figura 1: Efeito do tratamento com quercetina sobre o tempo de interação social de ratos submetidos ao modelo experimental de autismo induzido por ácido valpróico (VPA). ### $P<0.001$ diferente do grupo controle. *** $P<0.001$ diferente do grupo VPA.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes GPx (Figura 2C) e GST (Figura 2D) o VPA induziu redução da atividade destas enzimas comparado ao controle. O tratamento com quercetina foi capaz de prevenir somente a alteração na enzima GST quando comparado ao grupo VPA. Não foi observada diferença significativa quanto ao conteúdo SH total (Figura 2B).

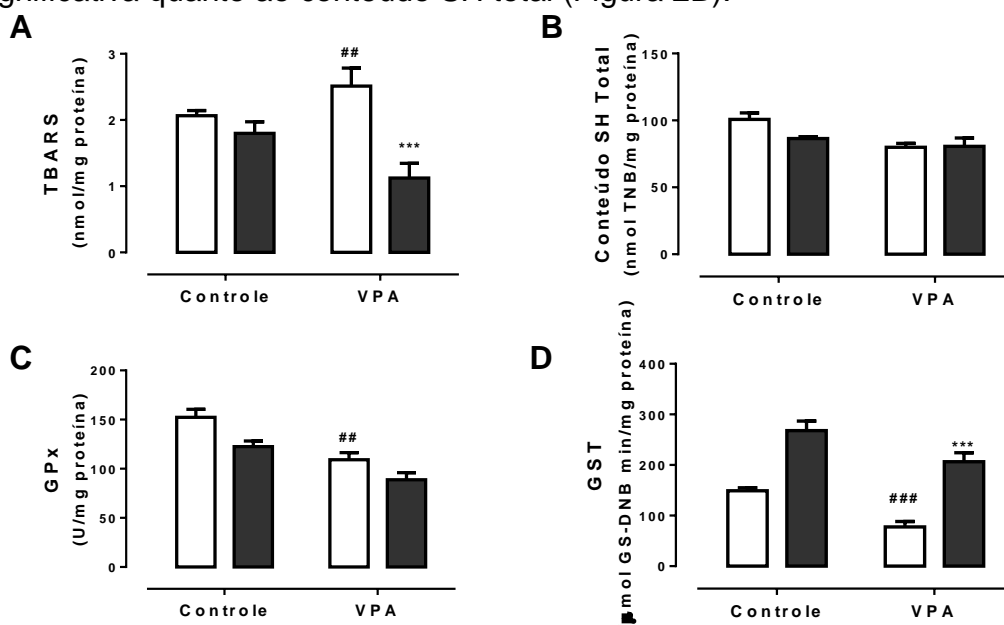


Figura 2: Efeitos do tratamento com quercetina sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (A), conteúdo tiólico total (SH) (B) e sobre a atividade das enzimas glutaciona peroxidase (GPx) (C) e glutaciona-S-transferase (GST) (D), em hipocampo de ratos submetidos ao modelo experimental de autismo induzido por ácido valpróico (VPA). ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ diferente do grupo controle. *** $P<0.001$ diferente do grupo VPA.

Exames funcionais de neuroimagem em autistas, demonstraram que a região do hipocampo está usualmente implicada na memória verbal em tarefas de associações entre datas a dias da semana (ZILBOVICIUS et al., 2006). Considerando que o encéfalo é uma região rica em lipídeos de membrana, isso o torna altamente susceptível à peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2012). No presente estudo a quercetina conseguiu prevenir as alterações sobre a interação social e sobre os parâmetros de estresse oxidativo, este efeito pode ser justificado possivelmente pela ação antioxidante deste composto (ATALA et al., 2017).

4. CONCLUSÕES

Na busca de alternativas terapêuticas, compostos antioxidantes naturais com atividade neuroprotetora como a quercetina podem ser uma solução para

prevenir o desencadeamento do autismo, em especial em situações onde gestantes precisam fazer uso de terapia anticonvulsivante ou em casais que já possuem filhos com autismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p.141-145, 2001.

ATALA, E.; FUENTES, J.; WEHRHAHN, M. J.; SPEISKY, H. Quercetin and related flavonoids conserve their antioxidant properties despite undergoing chemical or enzymatic oxidation. **Food Chemistry**, v. 234, p. 479-485, 2017.

CHANG, Y. C.; COLE, T. B.; COSTA, L. G. Behavioral phenotyping for autism spectrum disorders in mice. **Current Protocols in Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 1-11, 2017.

CHEN, H.; LU, C.; LIU, H.; WANG, M.; ZHAO, H.; YAN, Y.; HAN, L. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 110-117, 2017.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, vol.186, p.407-421,1990.

FRUSTACI, A.; NERI, M.; CESARIO, A.; ADAMS, J. B.; DOMENICI, E.; DALLA BERNARDINA, B.; BONASSI, S. Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, v. 10, p. 2128-2141, 2012.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

KASHYAP, D.; SHARMA, A.; MUKHERJEE, T. K.; TULI, H. S.; SAK, K. Quercetin and ursolic acid: dietary moieties with promising role in tumor cell cycle arrest. **Austin Oncology**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2016.

RUBENSTEIN, E.; WIGGINS, L. D.; SCHIEVE, L. A.; BRADLEY, C.; DIGUISEPPI, C.; MOODY, E.; PANDEY, J.; PRETZEL, R. E.; HOWARD, A. G.; OLSHAN, A. F.; PENCE, B. W.; DANIELS, J. Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development. **Autism**, v. 1, p. 1-13, 2018.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

ZILBOVICIUS, M.; MERESSE, I.; BODDAERT, N. Autism: neuroimaging. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 28, n. 1, p.21-28, 2006.

ZUCKER, I. Risk mitigation for children exposed to drugs during gestation: A critical role for animal preclinical behavioral testing. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 107-121, 2017.