

3-((4-CLOROFENIL)SELENIL)-2-FENILBENZOFURANO REDUZ PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CÉREBRO DE CAMUNDONGOS *IN VITRO*

ANALICE BARCELLOS BALHEGO¹; JÉSSICA IARA GALL²; AMÁLIA
GONÇALVES ALVES³; JORGE FRANCO COELHO DIAS⁴; CÉSAR AUGUSTO
BRÜNING⁵; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

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

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) é resultante de um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de remoção das mesmas (BARBOSA et al., 2010). Ele resulta na oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial, podendo causar morte celular.

Em especial, o dano oxidativo aos lipídios é conhecido como peroxidação lipídica, processo que é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagada por radicais peroxilas. Resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e eisoprostanos que podem ser detectados em amostras biológicas (SILVA, ABDALLA; 2001). O EO está envolvido na patogênese de diversas doenças incluindo os transtornos neurodegenerativos e psiquiátricos (KIM; KIM, 2018). Diversas razões tornam o cérebro particularmente suscetível ao EO como, por exemplo, alto grau de lipídios poliinsaturados, modesto sistema de defesa antioxidante, auto-oxidação de neurotransmissores, presença de metais de transição, altas concentrações de glutamato e cálcio, alto consumo de glicose e oxigênio, dentre outros (COBLEY et al., 2018).

Assim, pesquisas têm se voltado para o desenvolvimento de compostos com atividade antioxidante e potencial neuroprotetor. Os compostos orgânicos de selênio, muitos conhecidos por suas ações antioxidantes, tem emergido como uma abordagem terapêutica em diversos modelos experimentais de doenças humanas (NOGUEIRA, ROCHA; 2011). Somando-se a isso, os benzofuranos têm sido experimentalmente testados como possíveis terapias em modelos de doenças neurológicas (RIZZO et al. 2008). Deste modo, a união dos núcleos benzofurano e organosselênio em uma molécula parece uma proposta sintética em potencial. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar se o composto híbrido (BZF4; Fig. 1) seria capaz de reduzir a peroxidação lipídica em cérebro de camundongos *in vitro* bem como investigar sua possível ação scavenger de radicais.

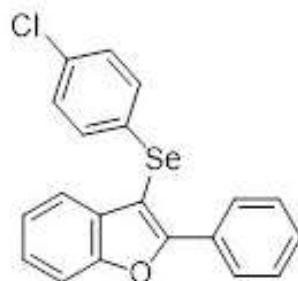


Figura 1. Estrutura química do composto
3-((4-clorofenil)selenil)-2-fenilbenzofurano (BZF4)

2. METODOLOGIA

2.1 Lipoperoxidação induzida por nitroprussiato de sódio (NPS)

A triagem da atividade antioxidante *in vitro* do composto BZF4 foi realizada através da dosagem dos níveis de lipoperoxidação induzida por NPS. O ensaio utilizado foi o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por OHKAWA et al. (1978). NPS foi utilizado como substância indutora de peroxidação lipídica. Os resultados foram expressos como nmol TBARS/g de tecido.

O cérebro de camundongos foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em uma proporção de 1/10 (peso/volume), submetido à centrifugação e o sobrenadante (S1) foi utilizado para o ensaio. O composto BZF4 foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e testado nas concentrações de 1-200 μ M. O grupo veículo recebeu apenas DMSO; o grupo controle, água.

2.2 Captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

Com o objetivo de investigar a capacidade do composto BZF4 de agir como *scavenger* de radicais específicos, foram realizadas as técnicas de captura dos radicais sintéticos ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]). O teste do ABTS se baseou na metodologia de RE et al. (1999) e o teste de DPPH[•] se baseou na metodologia de SHARMA et al. (2009). O fundamento das técnicas é avaliar se a molécula a ser testada apresenta a capacidade de doar elétrons para o radical livre inativando-o e tornando-o um composto eletricamente estável de acordo com OLIVEIRA (1999). Para ambos os ensaios, o composto BZF5 foi dissolvido em DMSO e testado nas concentrações de 1-50 μ M. DMSO foi utilizado como veículo e água foi utilizada para o branco (tubo controle). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como um controle positivo (*scavenger* de radicais) na concentração de 50 μ M. Os resultados foram calculados e expressos como percentagem (%) do branco.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 7.04 e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls (BZF5) ou ainda, pelo teste T não pareado (ácido ascórbico). Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do composto BZF4 frente a peroxidação lipídica causada por SNP em cérebro de camundongo estão demonstrados na fig. 2.

Como pode ser observado, o NPS causa um aumento significativo nos níveis de TBARS, tanto no grupo Induzido (água) quanto no grupo Veículo (DMSO) quando comparados ao grupo controle. A concentração de 100 μ M do BZF4 apresentou proteção parcial, enquanto que a concentração de 200 μ M apresentou proteção total contra o aumento dos níveis peroxidação lipídica induzida por NPS ($F_{(7,16)}=9.053$; $p=0,0001$). As demais concentrações (10-50 μ M) não foram efetivas.

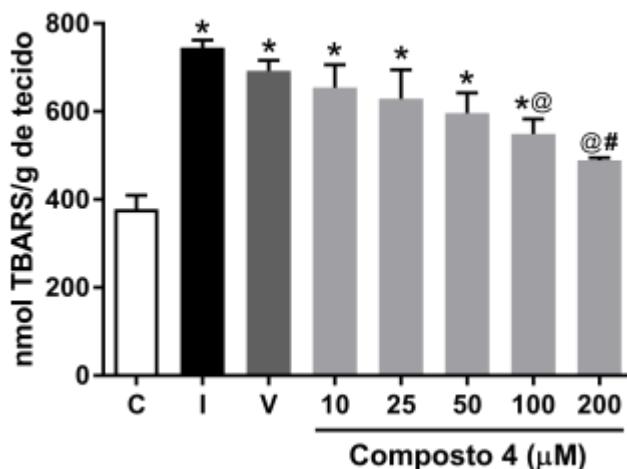


Fig 1. Efeitos do BZF4 sobre os níveis de lipoperoxidação induzida por SNP em homogenato de cérebro de camundongo *in vitro*. Os dados representam a média± EPM de 3 experimentos independentes e os resultados estão expressos como nmol de TBARS/g de tecido. *p<0,05 comparado ao controle (C); @p<0,05 comparado ao induzido (I); #p<0,05 comparado ao veículo (V).

Os resultados de avaliação da capacidade do BZF4 de agir como *scavenger* dos radicais sintéticos ABTS^{•+} e DPPH[•] *in vitro* estão demonstrados na fig 2.

De acordo com a análise estatística do teste de Kruskal-Wallis (Fig. 2A), o composto BZF4, em diferentes concentrações (1-50 M), não agiu como um scavenger do radical ABTS, uma vez que a concentração destes radicais (%) não foi diminuída em relação ao grupo veículo (p=0,0751).

Em contrapartida, o controle positivo AA foi efetivo em neutralizar eficientemente a quase totalidade dos radicais ABTS.

De forma similar, a fig. 2B mostra que BZF4 em todas concentrações testadas não agiu como scavenger de radical DPPH ($F_{(5,12)}=0,3635, p = 0,8639$).

Como esperado, o AA reduziu significantemente a % de radicais em relação ao grupo veículo, comprovando seu efeito *scavenger* de radicais (p<0,0001).

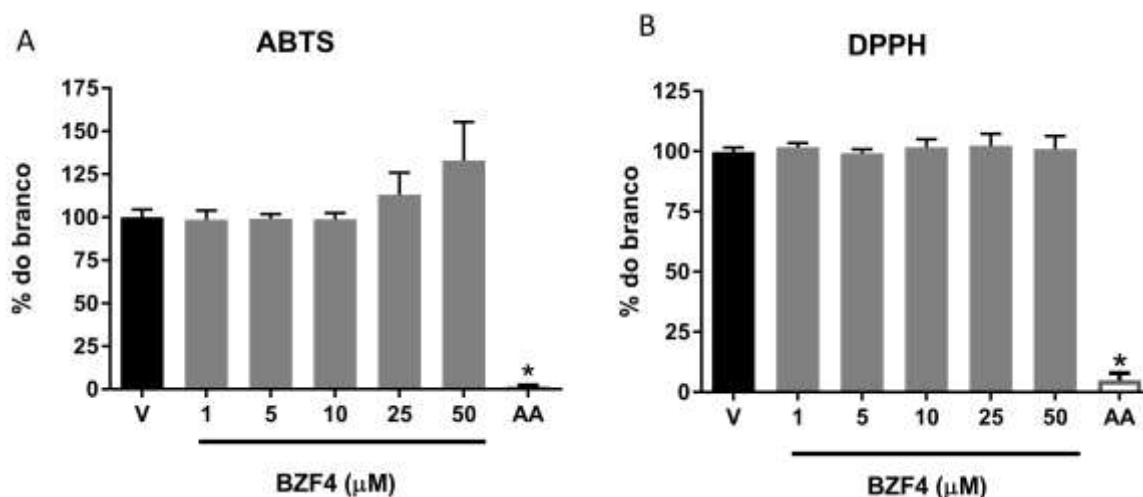


Fig 2. Ensaio de capacidade *scavenger* do radical ABTS^{•+} (A) e radical DPPH[•] (B) na presença de BZF4. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes e os resultados estão expressos em porcentagem

(%) do branco (água). AA significa ácido ascórbico (controle positivo). *p<0,05 comparado ao veículo (V).

4. CONCLUSÕES

Em suma, o composto BZF4 atenua a peroxidação lipídica induzida por NPS em cérebro de camundongos *in vitro*. Deste modo, pode-se dizer que este composto híbrido age exercendo ação antioxidante, porém não é capaz de sequestrar os radicais ABTS e DDPH. Assim, faz-se necessário a investigação de outros mecanismos que possam contribuir para seu efeito antioxidante. Sugere-se que o BZF4 apresenta potencial para ser testado em modelos experimentais de doenças que envolvam dano oxidativo ao sistema nervoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, KIRIAQUE BARRA FERREIRA ET AL. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v.23, n.4, p. 629-643, 2010.
- COBLEY JN, FIORELLO ML, BAILEY DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biol.** v. 15, p.490-503, 2018.
- KIM SH, KIM H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. **Nutrients.** v. 10, p. E1137, 2018.
- LIMA ES, ABDALLA DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Ciênc Farmac.** V. 37, n.3. p.293-303 ,2001.
- NOGUEIRA CW, ROCHA JB. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, vol. 85, p. 1313-1359, 2011.
- OHKAWA H; OHISHI N; YAGI K. Assay for peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v.95 p. 351-358, 1979.
- RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.
- RIZZO, S., et al. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry** p.2883- 2886, 2008.
- SHARMA OP; BHAT TK. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113 p.1202-1205, 2009.