

ATIVIDADE DE UM DERIVADO QUINOLINICO NA REVERSÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E REDUÇÃO DE NÍVEIS CEREBRAIS DE COLESTEROL INDUZIDOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM CAMUNDONGOS

JENIFER FETTER¹; RODOLFO BALDINOTTI², MARIANA FRONZA², CRISTIAN
MARTINI²; DIEGO ALVES⁴; LUCIELLI SAVEGNAGO³

¹Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas –
jenifer.fetter@gmail.com

²Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas –
rodolfotga@hotmail.com; nanaa.fronza@gmail.com; cristianmartinibiotec@gmail.com

³Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia da Universidade Federal de Pelotas –
lucielisavegnago@yahoo.com.br

⁴Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da Universidade Federal de Pelotas –
dsalves@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre moléculas pró e antioxidantes, havendo uma redução das defesas antioxidantes ou aumento das moléculas pró-oxidantes, acarretando uma série de danos as biomoléculas do organismo humano, como os lipídeos (ANTHONYMUTHU *et al.*, 2016). O dano aos lipídeos é conhecido como peroxidação lipídica e, é responsável pela degradação de membranas celulares, resultando numa série de eventos prejudiciais, como perda da polaridade da membrana, criação de poros, ou mesmo a degeneração da bainha de mielina (CAILLAUD *et al.*, 2018).

A bainha de mielina formada pelo enovelamento da membrana dos oligodendrócitos no entorno dos axônios neuronais, apresenta um papel essencial na transmissão de sinal entre os neurônios no sistema nervoso central (SNC) (CAI; XIAO, 2016). Os danos causados a esta estrutura celular podem acarretar sérios problemas na comunicação eficiente entre neurônios, como retardo ou parada da passagem do potencial de ação.

Visto que a bainha de mielina apresenta um alto teor lipídico, como o colesterol, ela se torna suscetível a degeneração por ação da peroxidação lipídica, característica de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA).

A fase inicial da DA, anterior a presença de sintomas clínicos, apresenta marcadores da peroxidação lipídica, o que corrobora também com a presença de alterações morfológicas e degradação da bainha de mielina, caracterizando uma fase celular da doença (WU *et al.*, 2017). Os dados da literatura, indicam que a degradação da mielina possa ser um dos gatilhos responsáveis pelo início das mudanças patológicas encontradas na DA, previamente a presença de marcadores clássicos, como a deposição de placas β -amilóide e Tau hiperfosforilada (CAI; XIAO, 2016).

Além disso, a fase inicial da DA apresenta um caráter neuroinflamatório, com a presença da ativação exacerbada da microglia, levando a liberação citocinas pró-inflamatórias, neurotoxinas e um desequilíbrio no estado redox (ROCHA *et al.*, 2011). O processo de degeneração promovido pelo EO é facilitado pela alta utilização de oxigênio, baixos níveis de defesas antioxidantes e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados no SNC (SANTOS *et al.*, 2015).

Visando melhor entender a fase inicial da doença, os modelos animais como o uso do lipopolissacarídeo (LPS), proveniente da membrana celular de bactérias Gram negativas, vem sendo utilizados (ERNST *et al.*, 2018). O LPS é capaz de induzir a neuroinflamação característica desta etapa da DA, em uma exposição crônica e remittente, semelhante ao que ocorre na etapa de

neuroinflamação da DA. Somado a isso, o LPS ainda promove o estresse oxidativo e a presença de marcadores clássicos da DA.

Embora a DA apresente um grande impacto sobre a população global, os tratamentos atualmente disponíveis ainda não apresentam grande eficiência, devido ao caráter complexo e multifatorial da doença. Desse modo, a descoberta de novas moléculas capazes de atuar na fase inicial da doença são de extrema importância.

Nesse sentido, a molécula 1-(7-cloroquinolino-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxiamida (QTC-4-MeOBnA) já demonstrou efeitos protetores em modelos da DA induzidos por estreptozotocina (STZ), modulando vias oxidativas, cascata amiloidogênica e via colinérgica.

Portanto, levando em conta o que foi exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação QTC-4-MeOBnA frente ao modelo inicial da DA, induzido por LPS em camundongos, na peroxidação lipídica e integridade da bainha de mielina.

METODOLOGIA

A molécula QTC-4-MeOBnA (Figura 1) foi sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas e foi administrado pela via intragástrica (i.g.), na dose de 1 mg/Kg durante três dias.

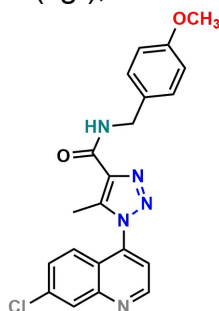


Figura 1. Estrutura química do QTC-4-MeOBnA

Para realização dos estudos, camundongos Swiss machos foram utilizados, submetidos a condições padrão de alojamento. Para a realização das análises bioquímicas, foram extraídos o córtex total e hipocampo dos camundongos. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA 2514-2018).

A indução da DA foi feita por meio da injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS (*Escherichia coli* 0127:B8), na dose de 250 µg/Kg durante sete dias (figura 2), a fim de induzir uma inflamação remittente.

Os animais foram divididos em seis grupos cada um contendo 9 animais e foram submetidos ao protocolo mostrado no esquema abaixo.

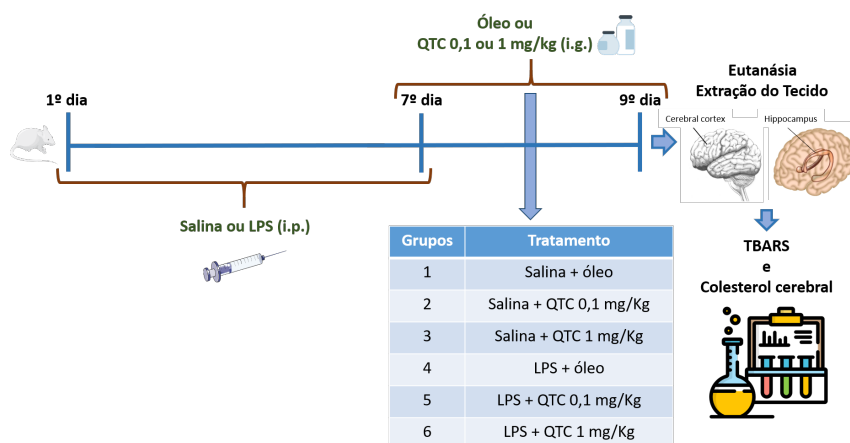


Figura 2. Esquema do protocolo experimental. Abreviações: QTC: QTC-4-MeOBnA; LPS: lipopolissacarídeo; i.p.: intraperitoneal; i.g.: intragástrica.

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por OHKAWA (1979). Um dos produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), que em altas temperaturas e pH ácido, reagem com o ácido tiobarbitúrico. O produto dessa reação é um cromóforo rosa, que pode ser lido no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532nm.

Visando avaliar a integridade da bainha de mielina, o colesterol foi dosado como medida indireta, visto que é um dos lipídeos majoritários que compõem esta estrutura. O colesterol foi extraído do córtex total e hipocampo, utilizando o protocolo experimental de extração lipídica descrito por SANTOS *et al.* (2015). Após a extração, o colesterol foi detectado através do kit comercial da Labtest.

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad, através da análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão e os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio TBARS, o LPS foi capaz de induzir um aumento da peroxidação lipídica (figura 3). Além disso, foi capaz de reduzir a integridade da bainha de mielina, visto que reduziu os níveis de colesterol (figura 4). Um dos marcadores do EO, é a peroxidação lipídica, correspondente a uma cascata de eventos bioquímicos, resultantes da ação de espécies reativas (ER) sobre ácidos graxos insaturados. Assim, a bainha de mielina, composta por um nível elevado de lipídeos insaturados, sofre ação desta peroxidação, sendo degradada e perdendo sua função essencial no SNC.

Frente aos resultados obtidos no grupo de animais que recebeu LPS, a administração de QTC-4-MeOBnA foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica, dessa maneira, revertendo os danos gerados a bainha de mielina, indicado pelo aumento dos níveis de colesterol, um marcador indireto da integridade da mesma.

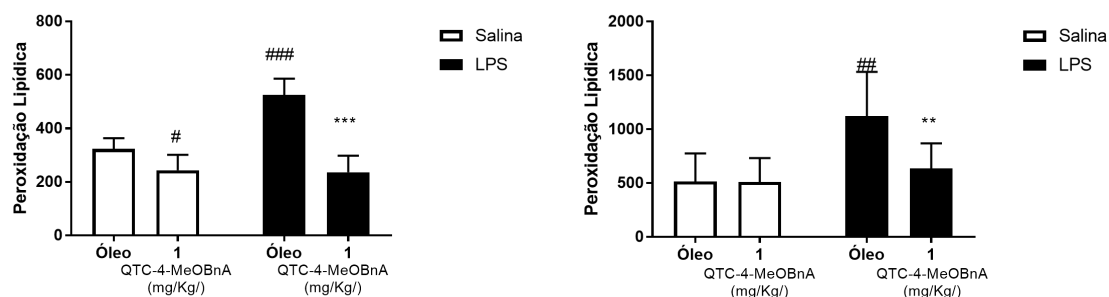


Figura 3. Efeito do QTC-4-MeOBnE nos níveis de peroxidação lipídica em camundongos. (A): córtex total; (B): hipocampo. Os resultados foram expressos em nmol malondialdeído. Cada coluna representa média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle e *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo induzido.

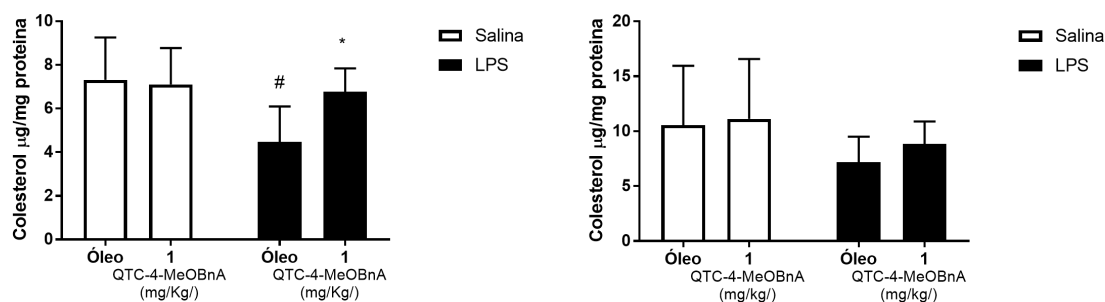


Figura 4. Efeito do QTC-4-MeOBnA nos níveis de colesterol em camundongos desafiados com LPS. (A): córtex total; (B): hipocampo. Os resultados foram expressos em µg/mg de colesterol. Cada coluna representa média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. [#]p < 0,05 quando comparado ao grupo controle e ^{*}p < 0,05 quando comparado ao grupo LPS.

4. CONCLUSÕES

Partindo do que foi exposto, a QTC-4-MeOBnA demonstrou capacidade de reverter a redução dos níveis de colesterol nas estruturas de córtex e hipocampo após a administração crônica de LPS. Esse fenômeno pode ter sido atribuído a redução da peroxidação lipídica nessas regiões, entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a ação da molécula frente ao modelo inflamatório inicial da DA induzida por LPS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONYMUTHU, T. S. *et al.* Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. **Brain Research**. v. 1640, p. 57-76, 2016..
- CAI, Z.; XIAO, M. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. **International Journal of Neuroscience**. v.126, p.97-104, 2016.
- CAILLAUD, M. *et al.* Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. **Neuropharmacology**. v.139, p.98-116, 2018.
- ERNST, T. R. *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationship of structure to activity and function. **The FASEB Journal**. Rockville, v.8, p.217-225, 2018..
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, n.2, p.351-358, 1979.
- ROCHA, N. P. *et al.* Processo Inflamatório e Neuroimunomodulação na Doença de Alzheimer: Revisão de Literatura. **Revista Neurociências**. São Paulo, v.19, n.2, p.300-313, 2011.
- SANTOS, D. B. *et al.* Probucol mitigates streptozotocin-induced cognitive and biochemical changes in mice. **Neuroscience**. Amsterdam, v.284, p.590-600, 2015.
- WU, Y. *et al.* Alterations of myelin morphology and oligodendrocyte development in early stage of Alzheimer's disease mouse model. **Neuroscience Letters**. v.642, p.102-106, 2017.