

2-FENIL-3-(FENILSELANIL)BENZOFURANO ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARA-CLOROFENILALANINA EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS

**JÉSSICA IARA GALL¹; AMÁLIA GONÇALVES ALVES²; LUIZ ROBERTO
CARRARO JUNIOR²; TAÍS DA SILVA TEIXEIRA RECH²; CÉSAR AUGUSTO
BRÜNING²; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO³**

^{1,2,3}Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM) – je.gall@hotmail.com; amaliaalvs@gmail.com;
luizrobertocarraro@hotmail.com; taisteixeira.r@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br;
cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, incluindo os transtornos psiquiátricos como a depressão. O termo estresse oxidativo refere-se aos efeitos danosos causados por radicais livres e outras espécies reativas (ER) ao organismo. O cérebro é bastante suscetível aos efeitos das ER devido ao seu elevado consumo de oxigênio associado à presença de ácidos graxos poli-insaturados altamente peroxidáveis (MOCKING *et al.*, 2018). Regiões cerebrais como hipocampo e amígdala foram relatadas como as mais suscetíveis ao estresse oxidativo. Estas regiões também estão envolvidas em alterações características da depressão, o que pode explicar a relação existente entre esta doença e o estresse oxidativo (SALIM *et al.*, 2017).

As reações químicas envolvidas nos danos causados por ER ocorrem de forma quase imediata, o que dificulta o processo de medição direta. Assim, podem ser avaliados produtos formados como consequência do dano oxidativo, como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são indicadores de peroxidação lipídica, (BETTERIDGE, 2000), e o conteúdo tiólico total, uma vez que os tióis presentes em peptídeos e proteínas são vulneráveis à oxidação. Outro indicador de estresse oxidativo é a alteração na atividade de enzimas antioxidantes, como é o caso da catalase (CAT) (HALLIWELL, 2012).

Já foi demonstrado que a serotonina possui ação antioxidante (AZOUZI *et al.*, 2017), além de estar relacionada à regulação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, enzima que catalisa o transporte ativo acoplado de Na^+ e K^+ , estabelecendo um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática (PEÑA-RANGEL *et al.*, 1999). Além disso, a diminuição nos níveis de serotonina também está associada ao desenvolvimento de depressão (BERGER *et al.*, 2009). A para-clorofenilalanina (pCPA) é um inibidor da triptofano hidroxilase, uma enzima envolvida na rota biossintética da serotonina. É conhecido que a administração de pCPA em roedores induz a redução dos níveis cerebrais de serotonina, além de um quadro de estresse oxidativo. Dados do nosso grupo de pesquisa têm indicado que o composto BZF1 apresenta atividade antioxidante *in vitro* e atividade do tipo antidepressiva em camundongos mediada pelo sistema serotoninérgico. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento com BZF1 em um modelo de estresse oxidativo induzido por pCPA em hipocampo de camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1 Composto

O composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (BZF1; Fig. 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) e os testes comportamentais

foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), ambos na UFPel.



Figura 1. Estrutura química do BZF1.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos adultos, pesando entre 25 e 35g. O projeto foi cadastrado no COCEPE sob o código 8784 e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel 4897-2017). Foram utilizados de 7-8 camundongos por grupo.

2.3 Modelo experimental

Os camundongos foram pré-tratados com pCPA (100 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.) ou veículo (salina 0,9%) por 4 dias consecutivos. 24 horas após o último tratamento, foi administrado BZF1 (50 mg/kg, via intragástrica (i.g.) ou veículo (óleo de canola). Trinta minutos após a administração de BZF1, os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC), e em seguida foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano. O hipocampo foi removido e homogeneizado em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados e o sobrenadante (S₁) foi separado para as análises. Para os parâmetros de estresse oxidativo, o teor de proteína foi determinado pelo método de LOWRY (1951), e para determinação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase os níveis de proteína foram medidos pelo método de BRADFORD (1976).

2.4 Ensaios ex vivo

2.4.1 Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para determinar a peroxidação lipídica, o ensaio de TBARS foi realizado conforme descrito por ESTERBAUER e CHEESEMAN (1990). Nesta metodologia, as frações S₁ foram misturadas com ácido tricloroacético (TCA) 15% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, seguido de aquecimento a 100°C durante 30 minutos e leitura da absorbância em espectrofotômetro a 532 nm.

2.4.2 Determinação do nível tiólico total

O conteúdo tiólico total foi medido pelo método descrito por AKSENOV e MARKESBERY (2001), que baseia-se na redução de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) por tióis, seguido de oxidação gerando um derivado amarelo denominado ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (TNB). Neste teste, as amostras de tecido (S₁) foram misturadas com PBS-EDTA 1 mM (pH 7,4) e DTNB 10 mM, seguido de incubação durante 1 hora e leitura da absorbância a 412 nm.

2.4.3 Ensaio de atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método descrito anteriormente por AEBI (1984), onde é avaliada a capacidade da CAT de decompor o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para este ensaio, as frações S₁ foram adicionadas a um meio reacional contendo tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e H₂O₂, sendo medida a absorbância a 240 nm.

2.4.4 Determinação da atividade de Na⁺/K⁺-ATPase

A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi determinada conforme a metodologia descrita por CARVALHO *et al.* (2012). As amostras de S₁ foram misturadas com MgCl₂ 6 mM, NaCl 50 mM, KCl 5 mM, EDTA 0,1 mM e Tris-HCl 30 mM (pH 7,4). A seguir, foram incubadas por 10 minutos a 37°C e a reação foi iniciada com a

adição de ATP 3 mM, seguida de incubação por 30 minutos. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido através do método descrito por CHAN *et al.* (1986).

2.5 Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada com o teste D'Agostino-Pearson Omnibus. As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.2.0. Efeitos principais estão demonstrados apenas na ausência de interação entre os tratamentos pCPA e BZF1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a administração de pCPA e posterior tratamento com BZF1 estão demonstrados na figura 2. O pCPA causou alterações em todos os parâmetros avaliados, sendo capaz de induzir dano oxidativo em hipocampo de camundongos, conforme evidenciado pelo aumento nos níveis de TBARS (Fig. 2A), redução no conteúdo tiólico total (Fig. 2B) e aumento na atividade da catalase (Fig. 2C). A administração de pCPA também causou a inibição da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, uma enzima sulfidrídica (Fig. 2D).

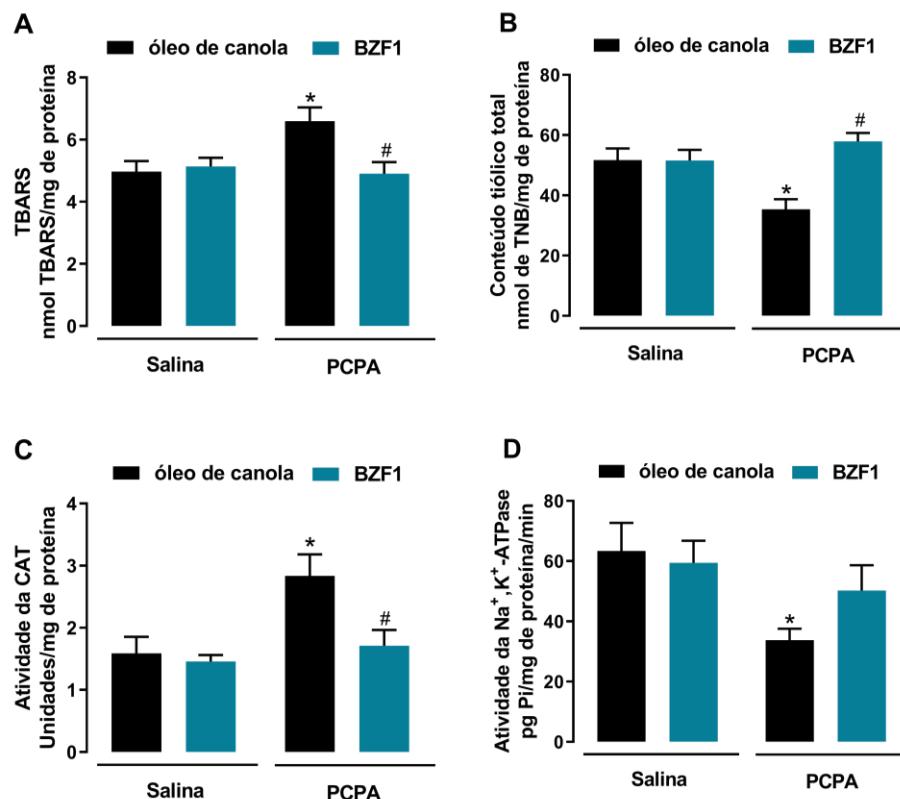


Figura 2. Efeito do pré-tratamento com pCPA (100 mg/kg, i. p.) e tratamento com BZF1 (50 mg/kg, i. g.) nos níveis de TBARS (A), conteúdo tiólico total (B), atividade da CAT (C) e atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (D) em amostras de hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M (n = 7-8). * p < 0.05 em comparação ao grupo controle. # p < 0.05 em comparação ao grupo pCPA. ANOVA de duas vias/Newman-Keuls.

O tratamento com BZF1 foi capaz de bloquear o efeito do pCPA sobre os níveis hipotalâmicos de TBARS [Interação pCPA x BZF1: $F_{(1,26)}=6,312$; p=0,0185] e conteúdo tiólico total [Interação: $F_{(1,26)}=11,34$; p=0,0024] bem como sobre a

atividade da catalase [Efeito principal pCPA e BZF1: $F_{(1,26)}=5,892$, $p=0,0224$ e $F_{(1,26)}=8,415$, $p=0,0075$, respectivamente], o que demonstra seu potencial antioxidante *ex vivo*. Ainda que a análise *post-hoc* dos dados não tenha demonstrado significância estatística, é possível observar que o BZF1 tem uma tendência em proteger parcialmente contra a redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase induzida por pCPA [Efeito principal do BZF1: $F_{(1,26)}=6,652$, $p=0,0159$].

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que a administração de pCPA foi capaz de alterar marcadores importantes relacionados ao estresse oxidativo, como lipoperoxidação, atividade da catalase e conteúdo tiólico. Esses resultados sugerem que a redução nos níveis de serotonina pode estar associada ao estresse oxidativo. O tratamento com BZF1, em uma dose capaz de produzir efeito do tipo antidepressivo em camundongos, apresentou potencial protetor contra o estresse oxidativo em hipocampo, indicando que o mecanismo de ação antioxidante pode estar envolvido com seu efeito do tipo antidepressivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- 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, n. 2-3, p. 141-145, 2001.
- AZOUZI, S.; SANTUZ, H.; MORANDAT, S. et al. Antioxidant and membrane binding properties of serotonin protect lipids from oxidation. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 9, p. 1863-1873, 2017.
- BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **The Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 355-366, 2009.
- BETTERIDGE, D. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, F. B. et al. Spermidine decreases Na^+/K^+ -ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 79-86, 2012.
- CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, p. 375-380, 1986.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MOCKING, R. J. T. et al. Focus on fatty acids in the neurometabolic pathophysiology of psychiatric disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 41, n. 4, p. 597-611, 2018.
- PEÑA-RANGEL, M. T.; MERCADO, R.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J. Regulation of glial Na^+/K^+ -ATPase by serotonin: Identification of participating receptors. **Neurochemical Research**, v. 24, n. 5, p. 643-649, 1999.
- SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.