

DISSELENETO DE *m*-TRIFLUORMETIL-FENILA: UM COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO CAPAZ DE REVERTER ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À PATOGÊNESE DA DEPRESSÃO INDUZIDAS POR RESERPINA EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS

CLEISSON SCHOSSLER GARCIA¹; CARLOS NATÃ DA SILVA ESPÍNDOLA¹;
GUSTAVO D'AVILA NUNES¹; CRISTINA WAYNE NOGUEIRA²; CRISTIANI
FOLHARINI BORTOLATTO¹; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING¹

¹*Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular, Universidade Federal de Pelotas – cleissonschossler@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.*

²*Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogêneos, Universidade Federal de Santa Maria.*

1. INTRODUÇÃO

A depressão maior é uma doença heterogênea e multifatorial caracterizada pela perda de interesse em atividades cotidianas, prejudicando significativamente a qualidade de vida dos pacientes. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2017), 300 milhões de pessoas, de diferentes idades, são afetadas pela depressão. A organização projeta ainda esta doença como a maior causa de incapacitação para o trabalho até 2030, resultando em uma perda significativa no meio social e econômico.

A patogênese da depressão originou algumas teorias, dentre elas estão a redução dos neurotransmissores monoaminérgicos, como a serotonina, dopamina e noradrenalina, a nível de sistema nervoso central (COPPEN, 1967), e a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (MERALI ET AL., 2004). Diversos estudos indicam também o envolvimento do estresse oxidativo com a patofisiologia da depressão (SALIM, 2017; BLACK, 2015; LOPRESTI, 2014), e em relação ao estresse oxidativo, o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) é um importante fator de transcrição que regula a resposta antioxidante intracelular, e sua ativação regulada pode ser um promissor mecanismo no tratamento da depressão (JARAMILLO, 2013). Além disso, a desregulação apoptótica também pode colaborar com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (GALLUZZI et al., 2008). Ademais, receptores glicocorticoides, local de ação do cortisol, são responsáveis por participar do mecanismo de resposta ao estresse, e a alta concentração deste hormônio pode resultar em apoptose neuronal e na diminuição neurogênica (VYAS, 2016; ODAKA, 2017).

A reserpina é uma substância que causa depleção de monoaminas, impedindo o acesso de neurotransmissores à vesícula sináptica, causando a auto-oxidação da dopamina. Além disso, a reserpina aumenta a produção de conjugados que podem causar danos neuronais e ativação da micróglia, podendo levar à neuroinflamação e, com isso, pode haver o desenvolvimento de sintomas depressivos. Compostos orgânicos contendo selênio em sua estrutura têm sido descritos como antidepressivos (BESCKOW et al., 2020), antioxidantes (BRUNING et al., 2015a) e neuroprotetores (BRUNING et al., 2015b). Nesse sentido, o disseleneto de *m*-trifluormetil-fenila (*m*-CF₃-PhSe)₂ (Fig. 1), um composto orgânico de selênio, demonstrou previamente efeito do tipo antidepressivo no teste do nado forçado em um modelo de depressão induzido por reserpina (dados não mostrados), e as análises neuroquímicas são essenciais para compreender os mecanismos de ação deste composto. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do (*m*-CF₃-PhSe)₂ nos níveis de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) clivada, uma proteína apoptótica, do subproduto do

estresse oxidativo 4-hidroxinonenal (4-HNE), de receptores glicocorticoides e do fator de transcrição NRF2 no hipocampo de camundongos após a administração de reserpina.

2. METODOLOGIA

A síntese de $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ foi realizada no Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogêneos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e a reserpina foi comprada da companhia norte americana *Sigma-Aldrich Corporation*. A técnica utilizada foi a de *Western Blot*. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFSM e foram utilizados de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-estar Animal (CEEA 4664250915).

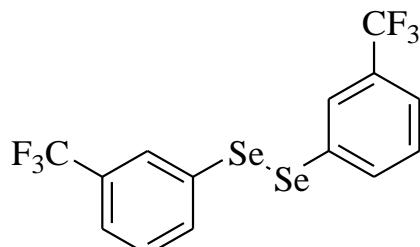


Figura 1. Estrutura química plana do disseleneto de *m*-trifluormetil fenila $[(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2]$

A reserpina foi diluída em solução salina 0.9% e administrada por três dias nos camundongos (uma vez ao dia), na dose de 0,5 mg/kg via intraperitoneal (i.p.), e nos dois dias seguintes, os animais foram tratados com $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ (uma vez ao dia), diluído em óleo de canola e administrado na dose de 10 mg/kg via intragástrica (i.g.). 30 minutos após o último tratamento com $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$, os animais foram eutanasiados com isoflurano e decapitados. Imediatamente, foram coletadas as amostras do hipocampo e armazenadas à -80 °C para o posterior procedimento da técnica de *Western Blot*.

As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA contendo um coquetel de inibidor de proteases e fosfatases. A concentração final de proteína em cada amostra foi ajustada para 2 µg/µl com um tampão de amostra contendo Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol, 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2-mercaptopetanol e azul de bromofenol. A concentração de proteína foi medida usando o kit de ácido bicinconílico (ensaio BCA). As amostras (30 µg de proteína) e padrões de peso molecular pré-corados foram separados em géis de eletroforese SDS-PAGE a 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Bio-rad) e bloqueadas com solução de leite a 5%. A carga de proteína foi confirmada por coloração Ponceau S. Em seguida, os blots foram incubados durante a noite a 4°C com o anticorpo primário. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo secundário, que continha uma peroxidase conjugada, por 1 h em temperatura ambiente. Para a detecção de proteínas, foi utilizado um kit de quimioluminescência e os sinais foram capturados com Amersham Imager 600. A densidade óptica das bandas foi quantificada usando o software Image J para Windows.

Cada valor obtido foi derivado da razão entre as unidades arbitrárias obtidas pela quantificação da banda da proteína e o respectivo teor de proteína da banda de β-Actina. Os dados foram expressos em porcentagem do controle e analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise realizada mostrou que a reserpina aumentou o nível de PARP clivada no hipocampo, e o tratamento com $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ reverteu a ativação dessa proteína nesta região [$F_{(1, 14)} = 7.99$, $P = 0.013$]. Ademais, após 3 dias de administração via i.p. de reserpina, houve um aumento nos níveis de receptores glicocorticoides e de 4-HNE no hipocampo, e o tratamento com $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ reverteu estes parâmetros [$F_{(1, 13)} = 10.33$, $P = 0.007$ e $F_{(1, 13)} = 6.761$, $P = 0.022$, respectivamente]. Em relação ao NRF2, houve uma tendência da reserpina em reduzir os níveis desta proteína e o $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ apresentou uma tendência em normalizar esses níveis.

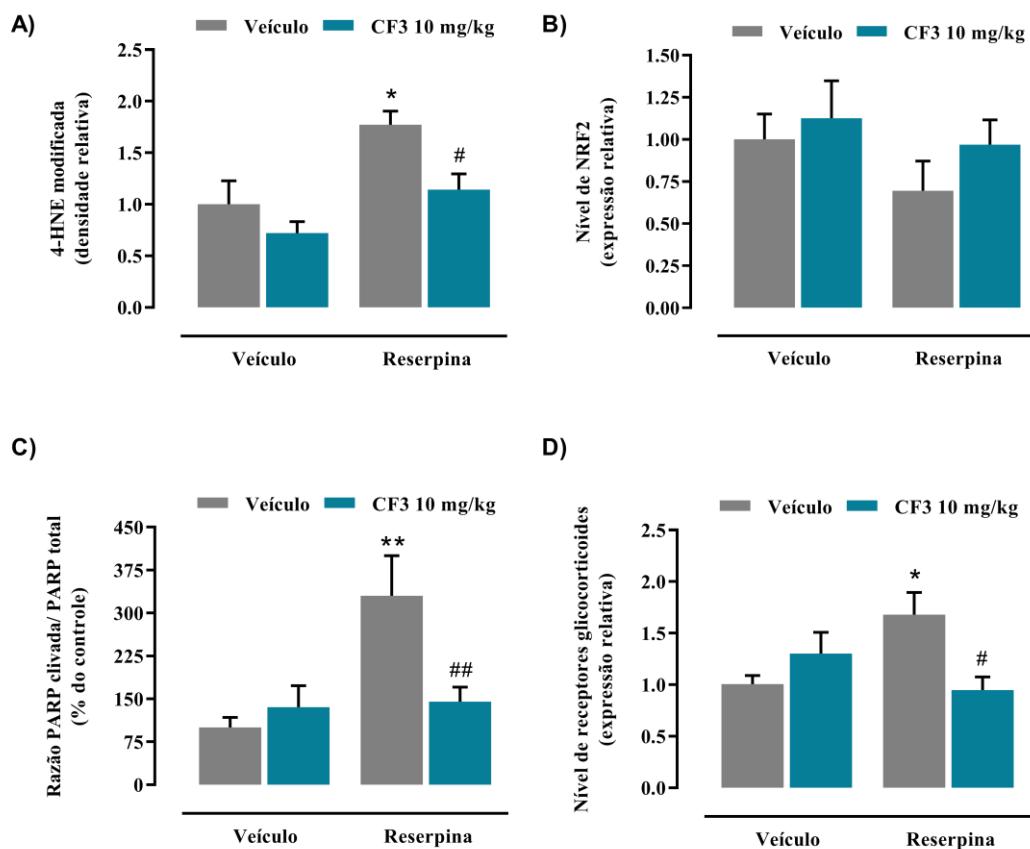


Figura 2. Efeito da interação entre reserpina e $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ (10 mg/kg, i.g.) em hipocampo de camundongos. 4-HNE modificada (A), nível de NRF2 (B), PARP clivada (C) e nível de receptores glicocorticoides (D). $N = 4\text{-}5$ animais. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ quando comparado ao grupo veículo e (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$ quando comparado ao grupo veículo-reserpina. (ANOVA de duas vias – Newman-Keuls).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os dados demonstrados, o $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ foi capaz de reverter os danos resultantes da administração da reserpina, sugerindo um efeito protetor frente as alterações das proteínas 4-HNE e PARP clivada, além dos receptores glicocorticoides. Além disso, os resultados obtidos por meio da análise do fator de transcrição NRF2 corroboram com estudos prévios da ação antioxidante de $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$. Mediante os resultados pré-clínicos obtidos neste trabalho, além de uma investigação mais profunda acerca deste composto, $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ poderia ser utilizado para evitar processos pró-oxidativos e apoptóticos e demais mecanismos associados à patogênese da depressão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESCKOW E. M., et al. Antidepressant-like effect of a selenopropargylic benzamide in mice and its involvement with the serotonergic system. **Psychopharmacology**. [Published online ahead of print, 2020 Jul 3], 2020.

BLACK, C. N., et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**. Amsterdam, 51, p.164-175, 2015.

BRUNING, C. A. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 63, p.35-46, 2015a.

BRUNING, C. A. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is attenuated by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **J Psychiatr Res**. 66-67, p.75-83, 2015b.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **The British journal of psychiatry: the journal of mental science**. 113, p.1237-1264, 1967.

GALLUZZI, L. et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. **Cell Death Differ**. 15, p.1113-1123, 2008.

JARAMILLO, M. C. & ZHANG, D. D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signalling pathway in cancer. **Genes Dev**. 27, p.2179-2191, 2013.

LOPRESTI, A. L. et al. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. Western Australia, 48, p.102-111, 2014.

MERALI, Z. et al. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. 24, p.1478-1485, 2004.

ODAKA, H. et al. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. **Neural Regen Res**. 12, p.1028-1035, 2017.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **J Pharmacol Exp Ther**. Texas, 360, p.201-205, 2017.

VYAS, S. et al. Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. **Neural Plast**. Braga, 2016.

WHO. **Depression and other common mental disorders: Global health estimates**. Geneva: World Health Organization, 2017.