

DERIVADO DE 2,3-DI-HIDROBENZOFURANO CONTENDO SELÊNIO MODULA INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E NEUROPLASTICIDADE EM CAMUNDONGOS COM DÉFICITS COGNITIVOS INDUZIDOS POR STZ

TÁCIA KATIANE HALL¹; PÂMELLA DA COSTA²; FERNANDA SEVERO
SABEDRA SOUSA³; VANESSA NASCIMENTO⁴; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING⁵;
CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – taciahall26@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pamelladacosta2002@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - fernandassabedra@gmail.com

⁴Universidade Federal Fluminense – nascimentovanessa@id.uff.br

⁵Universidade Federal de Pelotas - cabruning@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - cbortolatto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva e multifatorial, caracterizada pelo declínio cognitivo, perda de memória, desorientação espacial, alterações de humor e comportamento, sendo a forma mais comum de demência na população idosa (KNOPMAN; AMIEVA; PETERSEN *et al.*, 2021). Diversos mecanismos estão implicados na fisiopatologia da DA, incluindo processos inflamatórios, comprometimento sináptico, disfunções nos mecanismos de morte celular e alterações em vias relacionadas à sobrevivência neuronal. Diante da complexidade da doença e da limitada eficácia dos tratamentos disponíveis, cresce a demanda por novas estratégias terapêuticas capazes de modular múltiplas vias envolvidas na neurodegeneração (BAI; GUO; YE *et al.*, 2022). Compostos contendo selênio têm se destacado pelo seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor. Além disso, estruturas derivadas de 2,3-diidrobenzofuranos (2,3-DHBF) apresentam relevância farmacológica devido à sua versatilidade estrutural e atividade biológica (AZEVEDO; CORDEIRO; STRELOW *et al.*, 2023). Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos moleculares do composto 2-(((3-trifluorometil)fenil(selenil)metil)-2,3-di-hidrobenzofurano (TFSeB), um derivado selênico do 2,3-DHBF, em hipocampo de camundongos submetidos a um modelo experimental de DA induzido por estreptozotocina (STZ).

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA-UFPEL), sob o número 032391/2023-84. Para o estudo, foram utilizados camundongos Swiss machos, sendo mantidos no biotério sob temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. A STZ e a memantina foram dissolvidos em solução salina a 0,9%, sendo a STZ administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.) e a memantina por via intragástrica (i.g.). O composto TFSeB foi sintetizado no laboratório SupraSelen da Universidade Federal Fluminense (UFF), dissolvido em óleo de canola e administrado por via i.g., em volume fixo de 10 mL/kg.

O delineamento experimental compreendeu seis grupos experimentais: Naive (controle basal, sem qualquer manipulação), Sham (controle cirúrgico), STZ (modelo de DA), STZ + TFSeB 1 mg/kg, STZ + TFSeB 5 mg/kg e STZ + Memantina

10 mg/kg (controle positivo). Nos dias 1 e 3 do protocolo, os animais receberam injeções i.c.v. de 1,5 mg/kg de STZ por ventrículo (totalizando 3 mg/kg por animal), em um volume fixo de 3 μ L por ventrículo, visando à indução de déficits cognitivos compatíveis com DA. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém recebeu apenas solução salina (0,9%) por via i.c.v., enquanto o grupo Naive não foi submetido a nenhuma intervenção cirúrgica ou farmacológica. Do 4º ao 25º dia do protocolo, os grupos STZ + TFSeB (1 e 5 mg/kg) e STZ + Memantina (10 mg/kg) receberam tratamento diário por via i.g. com as respectivas substâncias. Os grupos STZ e Sham receberam apenas o veículo do composto (óleo de canola) por i.g. durante o mesmo período. Entre os dias 20 e 24, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da atividade locomotora e da memória. No 25º dia, os animais foram eutanasiados para a coleta de estruturas biológicas.

Isolamento de RNA e PCR quantitativa em tempo real: A extração de RNA total foi realizada com reagente TRIzol®, e a concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria. A síntese de cDNA foi conduzida com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o reagente GoTaq® qPCR Master Mix, utilizando o equipamento Stratagene Mx3005P. A expressão gênica foi normalizada utilizando β -actina como gene de referência. As análises foram realizadas apenas nos grupos Sham, STZ e STZ + TFSeB 5 mg/kg, utilizando tecido do hipocampo (n=4).

A análise estatística foi conduzida com o software GraphPad Prism (versão 8.2.0), por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração i.c.v de STZ tem sido amplamente utilizada para induzir déficits cognitivos e alterações moleculares semelhantes às observadas na DA, incluindo estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção sináptica (FAN; LIU; SUN *et al.*, 2022). Neste contexto, avaliamos os efeitos do TFSeB sobre a expressão de genes relacionados a processos inflamatórios, apoptóticos, oxidativos e de suporte neurotrófico no hipocampo, uma estrutura essencial para a memória, visto que os efeitos terapêuticos deste composto sobre a memória de camundongos neste modelo experimental já foram reportados.

A Figura 1 mostra os efeitos do composto TFSeB (5 mg/kg) na expressão gênica hipocampal de camundongos submetidos ao modelo de DA por STZ. Em relação à neuroinflamação, a análise estatística mostrou efeito significativo entre os grupos na expressão interleucina-6 (IL-6) [$F_{(2,9)} = 11,13$; $p = 0,0037$] (Fig 1A) e de NF- κ B [$F_{(2,9)} = 11,83$; $p = 0,0030$] (Fig 1B). Observou-se que a administração de STZ resultou em um aumento significativo na expressão de NF- κ B, um fator de transcrição central na resposta inflamatória, e IL-6, uma citocina pró-inflamatória diretamente regulada por NF- κ B. O tratamento com TFSeB foi capaz de atenuar significativamente os níveis de RNAm de ambos os marcadores, sugerindo uma ação anti-inflamatória eficaz. Esse efeito pode estar relacionado à regulação negativa da via clássica do NF- κ B. Essa via é normalmente ativada quando a enzima IKK fosforiza a proteína inibitória I κ B, promovendo sua degradação e permitindo que o complexo NF- κ B (formado pelas subunidades p65/p50) se transloque para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes inflamatórios

(ANILKUMAR; WRIGHT-JIN, 2024). A inibição dessa sequência de eventos reduz a ativação de genes pró-inflamatórios.

Do ponto de vista apoptótico, o grupo STZ apresentou um aumento na expressão do gene BAX, marcador pró-apoptótico, com diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,9)} = 10,30$; $p = 0,0047$] (Fig 1C). Em contrapartida, observou-se uma redução na expressão de BCL-2, proteína com função antiapoptótica essencial para a manutenção da integridade mitocondrial [$F_{(2,9)} = 16,79$; $p = 0,0009$] (Fig 1D). O tratamento com TFSeB restaurou o equilíbrio entre BAX e BCL-2, favorecendo a sobrevivência celular. Esses resultados indicam que o composto pode modular a via intrínseca de apoptose, possivelmente reduzindo a liberação de citocromo c e a ativação de caspases, processos exacerbados em modelos de neurodegeneração (CALLENS; KRASKOVSKAYA; DEREVTSOVA *et al.*, 2021).

Outro marcador de relevância foi a glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 β), uma enzima envolvida na fosforilação anormal da proteína tau e na regulação de vias inflamatórias e apoptóticas. A análise revelou um aumento significativo da expressão de GSK-3 β no grupo STZ [$F_{(2,9)} = 12,29$; $p = 0,0027$] (Fig 1E), enquanto o TFSeB reduziu esses níveis para valores semelhantes ao grupo controle. A inibição de GSK-3 β é considerada um alvo terapêutico promissor em doenças neurodegenerativas, pois essa quinase também interfere negativamente na neurogênese e na plasticidade sináptica (CHAUHAN; PALIWAL; JAIN *et al.*, 2022).

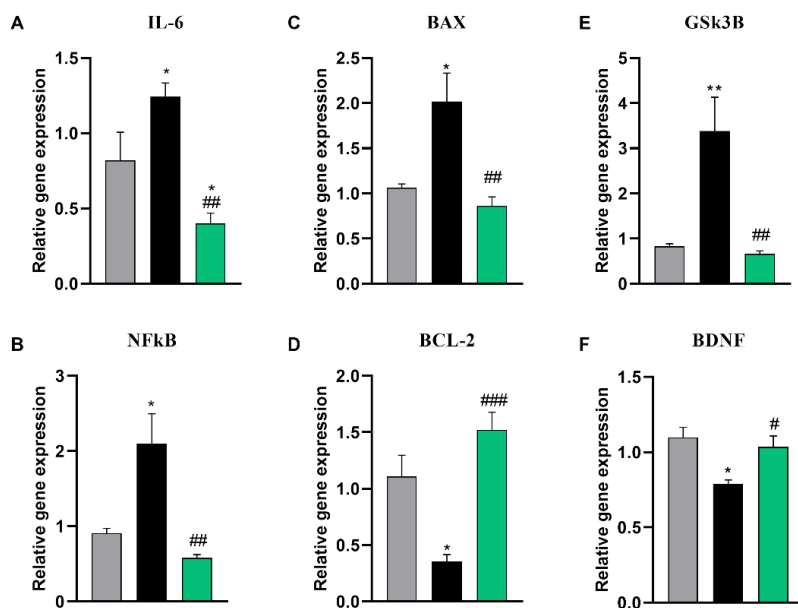


Figura 1. Efeitos do composto TFSeB (5 mg/kg) na expressão gênica hipocampal de camundongos submetidos ao modelo de DA por STZ. Níveis de mRNA de (A) IL-6, (B) NFkB, (C) BAX, (D) BCL2, (E) GSK3B e (F) BDNF. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.); $n = 4$ por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Newman-Keuls. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ indicam diferenças significativas em relação ao grupo sham; (#) $p < 0,05$, (##) $p < 0,01$ e (###) $p < 0,001$ indicam diferenças em relação ao grupo STZ.

Complementando esses achados, foi analisada a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), proteína fundamental para a plasticidade sináptica, consolidação da memória e sobrevivência neuronal. O grupo STZ apresentou uma redução acentuada na expressão de BDNF [$F_{(2,9)} = 16,79$; $p = 0,0009$] (Fig 1F), enquanto o tratamento com TFSeB restaurou esses níveis. O

aumento do BDNF pode estar relacionado à inibição indireta de GSK-3 β , já que essa enzima atua negativamente na transcrição de genes neurotróficos por meio da modulação de fatores como CREB (MARTINI; REGIS LEITE; GONCALVES ROSA *et al.*, 2020). A preservação dos níveis de BDNF reforça o potencial do TFSeB em promover suporte neurotrófico e plasticidade neuronal em um cenário de neurodegeneração.

Os dados apontam que o TFSeB pode exercer um perfil neuroprotetor multifacetado, com possíveis ações sobre vias inflamatórias, apoptóticas e de suporte neurotrófico. Esses efeitos podem estar, ao menos em parte, relacionados à presença do selênio em sua estrutura, considerando que esse elemento tem sido associado à modulação do estresse oxidativo e à proteção de biomoléculas frente a danos celulares (BARCHIELLI; CAPPERUCCI; TANINI, 2022).

4. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o composto TFSeB apresenta potencial neuroprotetor ao reverter alterações moleculares no hipocampo de camundongos submetidos a um modelo de DA induzido pela STZ. Esses efeitos podem estar relacionados à modulação de vias associadas à inflamação, apoptose e suporte neurotrófico, possivelmente contribuindo para a melhora da memória nos animais. Tais achados reforçam o potencial do TFSeB como candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANILKUMAR, S.; WRIGHT-JIN, E. NF-kappaB as an Inducible Regulator of Inflammation in the Central Nervous System. **Cells**, 13, n. 6, Mar 11 2024.
- AZEVEDO, A. R.; CORDEIRO, P.; STRELOW, D. N.; DE ANDRADE, K. N. *et al.* Green Approach for the Synthesis of Chalcogenyl- 2,3-dihydrobenzofuran Derivatives Through Allyl-phenols/ Naphthols and Their Potential as MAO-B Inhibitors. **Chem Asian J**, 18, n. 24, p. e202300586, Dec 14 2023.
- BAI, R.; GUO, J.; YE, X. Y.; XIE, Y. *et al.* Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. **Ageing Res Rev**, 77, p. 101619, May 2022.
- BARCHIELLI, G.; CAPPERUCCI, A.; TANINI, D. The Role of Selenium in Pathologies: An Updated Review. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 2, Jan 27 2022.
- CALLENS, M.; KRASKOVSKAYA, N.; DEREVTSOVA, K.; ANNAERT, W. *et al.* The role of Bcl-2 proteins in modulating neuronal Ca(2+) signaling in health and in Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, 1868, n. 6, p. 118997, May 2021.
- CHAUHAN, N.; PALIWAL, S.; JAIN, S.; VERMA, K. *et al.* GSK-3beta and its Inhibitors in Alzheimer's Disease: A Recent Update. **Mini Rev Med Chem**, 22, n. 22, p. 2881-2895, 2022.
- FAN, M.; LIU, S.; SUN, H. M.; MA, M. D. *et al.* Bilateral intracerebroventricular injection of streptozotocin induces AD-like behavioral impairments and neuropathological features in mice: Involved with the fundamental role of neuroinflammation. **Biomed Pharmacother**, 153, p. 113375, Sep 2022.
- KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C.; CHETELAT, G. *et al.* Alzheimer disease. **Nat Rev Dis Primers**, 7, n. 1, p. 33, May 13 2021.
- MARTINI, F.; REGIS LEITE, M.; GONCALVES ROSA, S.; PREGARDIER KLANN, I. *et al.* Strength exercise suppresses STZ-induced spatial memory impairment and modulates BDNF/ERK-CAMKII/CREB signalling pathway in the hippocampus of mice. **Cell Biochem Funct**, 38, n. 2, p. 213-221, Mar 2020.