

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Roberta Santos da Silva Coussirat

**PAPEL NEUROPROTETOR DO 4-PSQ SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPER-HOMOCISTEINEMIA AGUDA SEVERA**

Porto Alegre

2024

Roberta Santos da Silva Coussirat

**PAPEL NEUROPROTETOR DO 4-QSP SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPER-HOMOCISTEINEMIA AGUDA SEVERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Terezinha de Souza Wyse.

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Coussirat, Roberta Santos da Silva
PAPEL NEUROPROTETOR DO 4-QSP SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS À
HIPER-HOMOCISTEINEMIA AGUDA SEVERA / Roberta Santos da
Silva Coussirat. -- 2024.
55 f.
Orientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Homocisteína.. 2. Hiper-homocisteinemia severa..
3. 4-PSQ.. 4. Equilíbrio redox.. 5. Neuroproteção.. I.
Wyse, Angela Terezinha de Souza, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

As pessoas mais importantes da minha vida,
meus amados filhos Gabriel e Marcus Paulo,
meu esposo Paulo Vicente, meus pais, Paulo
e Mariza, meus irmãos Ismael e Isaac e a
minha amada sobrinha Antonella.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Angela Wyse, pelas orientações, por toda ajuda concedida, pela paciência e pela oportunidade de aprendizado durante o tempo que estive no laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas.

Aos colegas do laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas, pela ajuda.

A Prof^a Dr^a Ethel Antunes Wilhelm e doutoranda Ketlyn, por toda ajuda e atenção.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela formação e pela possibilidade de realizar este trabalho de pesquisa.

Agradeço ao órgão de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Departamento de Bioquímica e a todos os seus funcionários pelo auxílio.

Aos meus irmãos pelo amor e incentivo.

Aos meus pais, pelo amor, apoio e carinho.

Aos meus filhos e meu esposo, pelo amor, cuidado e por sempre acreditarem em mim.

A minha sobrinha pelo amor e pelos momentos de muita alegria.

A Deus, por ter me dado forças para concluir mais esta etapa na minha vida.

Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

A homocisteína (Hcy) um dos objetos de estudo desta dissertação é um aminoácido sulfurado não proteico derivado da metionina. O nível plasmático normal de Hcy está entre 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$ e níveis superiores são definidos como hiper-homocisteinemia (HHCY), que pode ser leve (16-30 $\mu\text{mol/L}$), moderada (31-100 $\mu\text{mol/L}$) e severa ou grave ($>100 \mu\text{mol/L}$). A HHCY severa ocorre na homocistinúria clássica (HCU), a qual é uma doença metabólica hereditária causada pela deficiência na atividade da enzima cistationina β -sintase, ao contrário da HHCY leve e moderada, que ocorrem através de uma dieta rica em metionina ou deficiência de ácido fólico e/ou de vitaminas (B6 e B12). Diante da toxicidade da Hcy, o objetivo do trabalho foi investigar o papel neuroprotetor do composto 7-cloro-4-(fenilselanyl)quinolina (4-PSQ), sobre os danos causados pela Hcy e avaliar se houve diferenças sexo-dependentes em ratos machos e fêmeas tratados com Hcy e 4-PSQ, que é derivado do grupo das quinolinas, apresenta diversos efeitos como: antioxidante e anti-inflamatório. Estudos pré-clínicos mostram que a hiper-homocisteinemia induz o estresse oxidativo. Ratos Wistar de 21 dias, de ambos os sexos, foram submetidos ao modelo HHCY severa aguda em córtex e hipocampo, através da administração de Hcy (0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal), duas vezes ao dia, por 7 dias, pela via subcutânea. Os grupos controles receberam o mesmo volume de solução salina. O composto 4-PSQ (5 mg/Kg) e o veículo, óleo de canola (1 mL/kg), foram administrados uma vez ao dia, por meio de gavagem, após 30 minutos da administração de Hcy. Os parâmetros de estresse oxidativo analisados, foram: atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona peroxidase (GSH-Px), oxidação de DCFH (DCF) e níveis de nitritos (RNS). Os resultados desse trabalho mostraram que a HHCY severa aguda promoveu o aumento das espécies reativas de oxigênio no córtex cerebral e no hipocampo de ratos machos e fêmeas e o composto 4-PSQ reverteu tais efeitos. Em relação às enzimas antioxidantes, a HHCY não alterou a atividade da SOD em nenhuma estrutura estudada em ambos os sexos. A HHCY não alterou a atividade da CAT, mas esta condição quando associada ao 4-PSQ aumentou a atividade da CAT em córtex de ratos machos. A HHCY aumentou a atividade da GPx em ambas estruturas analisadas (córtex e hipocampo) de machos. No entanto, em hipocampo de fêmeas a GPx aumentou apenas no grupo tratado com HHCy combinado com 4-PSQ quando comparada ao grupo tratado com 4-PSQ. Os níveis de nitritos não foram alterados em nenhuma estrutura analisada, em ambos os sexos. Considera-se, a partir dos resultados obtidos, que o composto 4-PSQ tenha efeito antioxidante sobre os danos causados pela hiper-homocisteinemia severa (HHCY), o qual foi mostrado pela reversão do aumento das espécies reativas de oxigênio causadas pela HHCY e por tentar recuperar as enzimas antioxidantes (CAT e GPx) em um ambiente oxidante. Com isso mais estudos devem ser realizados para assegurar que o 4-PSQ seja um possível tratamento promissor em estudos pré-clínicos e clínicos. Pois na última década, estudos têm enfoque na investigação do potencial farmacológico do composto sintético 7-cloro-4-(fenilselanyl), um derivado da quinolina com substituinte organoselênio. Ao modular marcadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo, além do nosso estudo também mostrar que o efeito sobre as enzimas é sexo-dependente.

Palavras-chave: homocisteína; hiper-homocisteinemia severa; 4-PSQ; equilíbrio redox; neuroproteção.

ABSTRACT

Homocysteine (Hcy), one of the objects of study in this dissertation, is a non-protein sulfur amino acid derived from methionine. The normal plasma level of Hcy is between 5 to 15 $\mu\text{mol/L}$ and higher levels are defined as hyperhomocysteinemia (HHCY), which can be mild (16-30 $\mu\text{mol/L}$), moderate (31-100 $\mu\text{mol/L}$) and severe or severe (>100 $\mu\text{mol/L}$). Severe HHCY occurs in classic homocystinuria (HCU), which is a hereditary metabolic disease caused by deficiency in the activity of the enzyme cystathionine β -synthase, unlike mild and moderate HHCY, which occur through a diet rich in methionine or methionine deficiency. folic acid and/or vitamins (B6 and B12). In view of the toxicity of Hcy, the objective of the work was to investigate the neuroprotective role of the compound 7-chloro-4-(phenylselanyl)quinoline (4-PSQ), on the damage caused by Hcy and to evaluate whether there were sex-dependent differences in rats males and females treated with Hcy and 4-PSQ, which is derived from the quinoline group, has several effects such as: antioxidant and anti-inflammatory. Preclinical studies show that hyperhomocysteinemia induces oxidative stress. 21-day-old Wistar rats, of both sexes, were subjected to the acute severe HHCY model in the cortex and hippocampus, through the administration of Hcy (0.6 $\mu\text{mol/g}$ of body weight), twice a day, for 7 days, by subcutaneously. Control groups will receive the same volume of saline solution. The compound 4-PSQ (5 mg/kg) and the vehicle, canola oil (1 mL/kg), were administered once a day, via gavage, 30 minutes after Hcy administration. The oxidative stress parameters analyzed were: activity of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione peroxidase (GSH-Px), DCFH oxidation (DCF) and nitrite levels (RNS). The results of this work showed that acute severe HHCY promoted an increase in reactive oxygen species in the cerebral cortex and hippocampus of male and female rats and the compound 4-PSQ reversed these effects. Regarding antioxidant enzymes, HHCY did not alter SOD activity in any structure studied in both sexes. HHCY did not alter CAT activity, but this condition, when associated with 4-PSQ, increased CAT activity in the cortex of male rats. HHCY increased GPx activity in both structures analyzed (cortex and hippocampus) of males. However, in the female hippocampus GPx increased only in the group treated with HHCy combined with 4-PSQ when compared to the group treated with 4-PSQ. Nitrite levels were not altered in any structure analyzed, in both sexes. It is considered, from the results obtained, that the compound 4-PSQ has an antioxidant effect on the damage caused by severe hyperhomocysteinemia (HHCY), which was shown by the reversal of the increase in reactive oxygen species caused by HHCY and by try to recover antioxidant enzymes (CAT and GPx) in an oxidizing environment. Therefore, more studies must be carried out to ensure that 4-PSQ is a possible promising treatment in preclinical and clinical studies. In the last decade, studies have focused on investigating the pharmacological potential of the synthetic compound 7-chloro-4-(phenylselanyl), a quinoline derivative with an organoselenium substituent. By modulating pro-inflammatory markers and oxidative stress, our study also shows that the effect on enzymes is sex-dependent.

Keywords: homocysteine; severe hyperhomocysteinemia; 4-PSQ; redox balance; neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
CAT	catalase
CBS	cistationina β -sintase
CoA	coenzima A
DA	doença de Alzheimer
DCFDA	diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína
DCFH	2',7'- diclorofluoresceína
DP	doença de Parkinson
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERRO	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase eritrocitária
GSH	glutaciona (forma reduzida)
GSSG	glutaciona (forma oxidada)
HCU	homocistinúria
Hcy	homocisteína
HHCY	hiper-homocisteinemia
HI	hipóxia-isquemia
HClO	ácido hipocloroso
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL- 6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
OH \cdot	radical hidroxila
MS	metionina sintase
MT	metionina transferase
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolato

NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO	óxido nítrico
NPSH	grupos sulfidrílicos não proteicos
Pi	fosfato inorgânico
Ppi	pirofosfato inorgânico
SAM	S-adenosilmetionina
SAH V S	adenosil-homocisteína
SOD	superóxido dismutase
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

PARTE I.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 HOMOCISTEÍNA.....	14
1.2 HHCY SEVERA	16
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO	17
1.3.1 Defesas Antioxidantes	18
1.4 COMPOSTO 7-CLORO-4-(FENILSELANIL)-QUINOLINA (4-PSQ)	19
1.5 DIMORFISMO SEXUAL.....	21
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
PARTE II	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	26
4.2 ANIMAIS	26
4.2.1 Modelo experimental agudo de Hiper-homocisteinemia severa aguda.....	27
4.3 PREPARAÇÃO DE TECIDO.....	28
4.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS	28
4.5 NÍVEIS DE NITRITOS	28
4.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	29
4.7 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	29
4.8 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX).....	29
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
PARTE III.....	31
5 RESULTADOS	32
5.1 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (DCFH).....	32
5.2 NÍVEIS DE NITRITOS	33
5.3 ATIVIDADE DA ENZIMA SOD.....	34
5.4 ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE.....	35
5.5 ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)	36
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES.....	44
8 PERSPECTIVAS.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	54
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)	55

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 HOMOCISTEÍNA

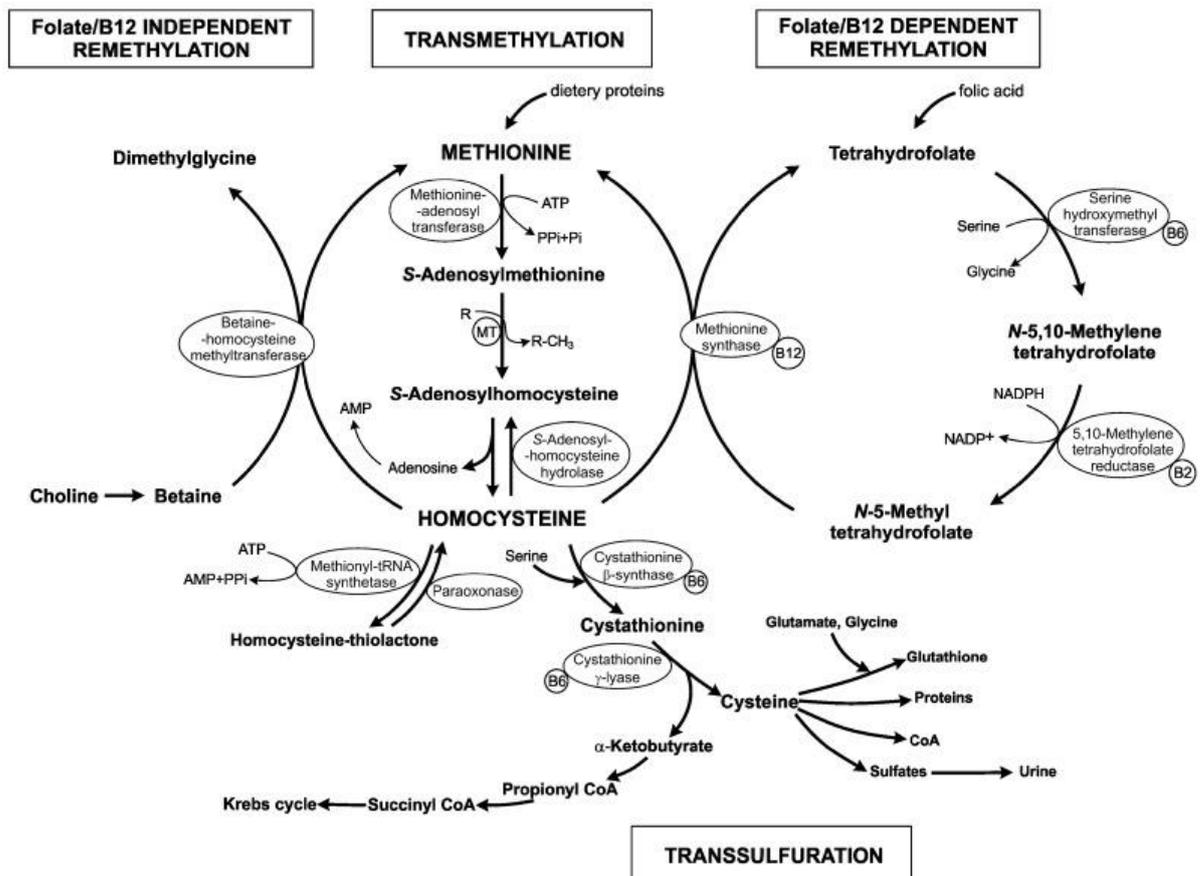
A homocisteína (Hcy) é um aminoácido sulfurado não proteico derivado da metionina. O nível plasmático normal de Hcy está entre 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$, níveis superiores são definidos como hiper-homocisteinemia (HHCY), que pode ser leve (16-30 $\mu\text{mol/L}$), moderada (31-100 $\mu\text{mol/L}$) e severa ou grave (>100 $\mu\text{mol/L}$). A HHCY leve e moderada, é uma condição que ocorre por causa da dieta rica em metionina ou pela deficiência de ácido fólico e de vitaminas do complexo B, tais como: B6, B9 e B12, ao contrário da HHCY severa que ocorre na homocistinúria (HCU), que é uma doença metabólica hereditária causada pela deficiência severa na atividade da enzima cistationina β -sintase, que é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de homocisteína e metionina.

A metionina, oriunda da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, é convertida em S-adenosil metionina em uma reação catalisada pela enzima metionina adenosiltransferase. A S-adenosil metionina, é um importante doador de grupos metil, é formada dentro da mitocôndria, sendo um cofator para uma mutase conhecida como metilmalonil-CoA-mutase. Na etapa seguinte ocorre a transmetilação da S-adenosilmetionina (SAM), com a produção de S-adenosil-homocisteína, por metiltransferases dependentes de SAM. A S-adenosil homocisteína (SAH) é a hidrolisada a adenosina e homocisteína, através da enzima adenosil homocisteína hidrolase. A homocisteína pode ser metabolizada em duas vias diferentes: remetilação com a regenerando da metionina e transulfuração com a produção da cisteína (Kim et al., 2018).

Na via de remetilação, a metionina é regenerada através de uma reação catalisada pela enzima metionina sintetase (MS), requerendo folato e vitamina B12 como cofatores (Visram et al., 2018). Como o folato não é biologicamente ativo, requer transformação em tetraidrofolato

(THF) que é então convertido em 5-metilenotetrahidrofolato (5-Me-THF) pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). A outra via responsável pelo metabolismo da Hcy é a transulfuração, a Hcy combina-se com a serina, em uma reação catalisada cistationina beta-sintase (CBS), para formar a cistationina, a qual é hidrolisada a cisteína e ao α -cetobutirato pela enzima cistationina γ -liase (Jacobsen, 2016). Portanto, quando os níveis Hcy é superior a 100 $\mu\text{mol/L}$ são considerados graves (Veeranki; Tyagi, 2013) ocorre a hiper-homocisteinemia (HHCY) severa ou grave, característico da homocistinúria (HCU), que é um erro inato do metabolismo causado por deficiência da CBS (Skovierová et al., 2016).

Figura 1 - Esquema das principais rotas de formação e degradação da Hcy



Legenda: Rota da Metionina-Homocisteína; MT (metionina transferase); radical CH_3 (grupo metila); ATP (adenosina trifosfato); ADP (adenosina difosfato); AMP (adenosina monofosfato); (NADPH) (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido); NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado); vitaminas B2, B6 e B12; PPi (pirofosfato inorgânico); Pi (fosfato inorgânico); CoA (Coenzima A).

Fonte: Skovierová et al. (2016).

1.2 HHCY SEVERA

A homocistinúria (HCU) clássica é um erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos sulfurados, associado à deficiência da enzima CBS. Essa desordem autossômica recessiva é geneticamente heterogênea, podendo ser causada por 92 diferentes mutações no gene que codifica a enzima CBS. As deficiências enzimáticas neonatais levam ao aumento da Hcy, foi constatado uma prevalência entre 1:200.000 a 1:335.000 nascidos vivos, quando há deficiência homozigótica da enzima CBS (Skovby; Gaustadnes; Mudd, 2010; Mudd, 2011; Sørensen et al., 2016). Quando há deficiências enzimáticas heterozigóticas a prevalência de 1:70 a 1:2.000 nascidos vivos (Neves; Macedo; Lopes, 2004).

Bioquimicamente, a HCU clássica é caracterizada pelo acúmulo tecidual de Hcy, acompanhado pela elevação dos níveis de seu precursor, o aminoácido essencial Met, assim como a redução dos produtos da via de transulfuração da Hcy, cistationina e cisteína. As concentrações plasmáticas normais de Hcy variam de 5-15 μM , podendo atingir 500 μM em pacientes homocistinúricos não tratados (Cunha, 2012). O desenvolvimento da doença apresenta alterações vasculares cardíacas, morte cerebral e degeneração celular. Os indivíduos acometidos, quando não tratados de maneira precoce com uma dieta restrita em aminoácidos e/ou com cofatores morrem prematuramente de isquemia cerebral e cardíaca (Wyse et al., 2021).

Estudos clínicos também mostram que pacientes homocistinúricos apresentam alteração no status oxidativo e inflamatório no sangue (Vanzin et al., 2011). Dentre os sinais e sintomas mais frequentes estão o atraso no desenvolvimento psicomotor, distúrbios psiquiátricos, crises convulsivas, aterosclerose, tromboembolismo, ectopia do cristalino, miopia, osteoporose, esteatose hepática, tromboembolismo pulmonar e uma variedade de deformações ósseas (Cunha, 2012).

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa comprovam os dados encontrados na literatura, que mostram que a Hcy diminui as defesas antioxidantes, os níveis de nitritos, aumenta a produção de espécies reativas e da peroxidação lipídica em coração de ratos machos jovens submetidos (Kolling et al., 2011).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITRATIVO

Radical livre é definido como uma espécie química que contém elétrons desemparelhados, o que os torna altamente reativos. Estas espécies são produzidas naturalmente pelas células por possuírem importantes funções biológicas, além de geralmente possuírem propriedades oxidantes (Halliwell; Cheah; Tang, 2018). São exemplos de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS) os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) e óxido nítrico (NO); e os não radicais H_2O_2 , oxigênio singlet (1O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) e o ácido hipocloroso (HClO) (Halliwell, 2007). Espécies Reativas de Nitrogênio são formadas por um grupo de enzimas denominado óxido nítrico sintases (NOS), que converte L-arginina em radical NO e em L-citrulina (Alderton; Cooper; Knowles, 2001 apud Cunha, 2012).

As espécies reativas são constantemente produzidas no organismo em níveis basais, principalmente durante o processo de respiração celular, através da redução incompleta do oxigênio molecular (que ocorre de 2 a 5%), mas quando em excesso, as espécies reativas induzem o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas e das defesas antioxidantes, que pode ser resultado tanto do aumento da produção dessas espécies, como da diminuição dos níveis de antioxidantes ou da combinação de ambos (Halliwell; Gutteridge, 2007). O estresse oxidativo tem sido associado a diversas patologias inflamatórias, as quais estão correlacionadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, porque o cérebro é muito sensível a agressões causadas por espécies reativas (Tarafdar; Pula, 2018).

O nosso organismo possui mecanismos de defesa contra a ação tóxica dos radicais livres e das espécies reativas, diminuindo ou eliminando as consequências negativas de seus efeitos. Há dois tipos de mecanismos de defesa antioxidantes: enzimáticas e não-enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem, principalmente, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) (Halliwell; Gutteridge, 2007) e as defesas antioxidantes não-enzimáticas incluem substâncias como a glutaciona reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), -tocoferol (vitamina E), melatonina, urato entre outras (Kalyanaraman, 2013).

Portanto, o estresse oxidativo e a inflamação, podem possuir um papel benéfico ou deletério, dependendo da sua intensidade (Valko et al., 2007). Um aumento na produção de ROS E RNS, com a diminuição das defesas antioxidantes no cérebro estão envolvidos na causa de várias doenças que afetam o sistema nervoso central, como as doenças neurodegenerativas (Popa-Wagner et al., 2013). O cérebro é muito suscetível aos ataques causados por espécies reativas (Tarafdar; Pula, 2018). Na literatura, há dados que demonstram o envolvimento da geração de espécies reativas em diversas doenças pulmonares, como na doença pulmonar obstrutiva crônica, na lesão pulmonar aguda e na asma (Al-Mehdi; Shuman; Fisher, 1997; Cunha et al., 2011; Kirkham et al., 2011). Além disso, a Hcy induz estresse oxidativo córtex parietal, hipocampo e fígado de ratos machos (Streck et al., 2003; Matté et al., 2009a; Matté et al., 2009b), como altera as defesas antioxidantes e promove a peroxidação lipídica, fatores estes que podem estar envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose e trombose (Cunha, 2011).

1.3.1 Defesas Antioxidantes

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) Os antioxidantes não-enzimáticos são representados

pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), GSH, carotenoides, flavonoides entre outros antioxidantes (Halliwell; Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011 apud Scherer, 2014).

A enzima SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion O^{2-} , gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e gás oxigênio (O_2). O H_2O_2 pode ser decomposto pelas enzimas CAT e GPx. A GPx, localiza-se nas membranas celulares, decompõe o H_2O_2 a partir do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da GSH ao dissulfeto de glutationa ou glutationa oxidada (GSSG), de acordo com a seguinte reação química: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$ (Halliwell; Gutteridge, 2007 apud Scherer, 2014).

A CAT atua na decomposição do $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O$. A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos da maioria dos tecidos em humanos, apresentando-se em maior quantidade no fígado, enquanto no cérebro está presente em pequenas quantidades (Marklund et al., 1982 apud Scherer, 2014).

1.4 COMPOSTO 7-CLORO-4-(FENILSELANIL)-QUINOLINA (4-PSQ)

O composto 7-cloro-4-fenilselanil-quinolina (4-PSQ) é derivado do grupo das quinolinas, que são compostos heterocíclicos nitrogenados, que se caracterizam pela presença de um anel benzênico e um piridínico fundidos e, se destacam por apresentarem importantes propriedades farmacológicas. Os derivados quinolínicos como o 4-PSQ apresentam propriedades farmacológicas relevantes que permitiram o desenvolvimento de vários fármacos com diferentes finalidades. O composto 4-PSQ, por ter na sua constituição selênio que é um mineral essencial, que possui importantes funções para a saúde do corpo humano. Esta classe de compostos tem apresentado diversas propriedades farmacológicas como antioxidante (Vogt et al., 2018).

Estudos mostraram que o 4-PSQ apresenta diferentes alvos que estão envolvidos em sua farmacologia, como o efeito antioxidante, anti-inflamatório, antinociceptivos e anticolinesterásica, neuroprotetor, ansiolíticos, anti-hiperglicêmicos, entre outros (Pinz et al., 2018; Vogt et al., 2018; Paltian et al., 2020). Resultados demonstraram que o efeito antioxidante do 4-PSQ, pode reparar o desequilíbrio redox, causado pelo envelhecimento, devido ao seu efeito antioxidante e contribuir para a restauração dos danos causados pelo envelhecimento, com o aumento dos níveis de selênio, após o tratamento com 4-PSQ, de modo a restaurar a homeostase no organismo (Luchese et al., 2020).

Além disso, estudos mostraram os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo agudo do 4-PSQ em camundongos e estes foram correlacionados com a propriedade antioxidante do 4-PSQ (Pinz et al., 2016). Estudos também sugerem o efeito terapêutico do 4-PSQ no tratamento de inflamação aguda e dados mostraram que a modulação dos níveis serotoninérgicos, nitrérgicos e sistemas glutamatérgicos contribuíram para o efeito antinociceptivo do 4-PSQ (Silva et al., 2017).

O potencial farmacológico do composto sintético 7-cloro-4-(fenilselanil), um derivado da quinolina com substituinte organoselênio, vem sendo estudado na última década. Ao modular marcadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo, foi relatado que o 4-PSQ é eficaz em modelos pré-clínicos de ansiedade (Reis et al., 2017; Paltian et al., 2020), nocicepção (Pinz et al., 2016; Silva et al., 2017), depressão (Oliveira et al., 2022), doença de Alzheimer (Pinz et al., 2018), dermatite atópica (Voss et al., 2018), toxicidades hepáticas e renais (Lemos et al., 2021; Motta et al., 2021), obesidade hipotalâmica (Rodrigues et al., 2021), neurotoxicidade induzida por oxaliplatina (Reis et al., 2020a; 2020b; Reis et al., 2022), neuropatia periférica (Paltian et al., 2022; Voss et al., 2022), envelhecimento (Luchese et al., 2020).

O 4-PSQ exibe um perfil de múltiplos alvos, modulando a neuroplasticidade, a atividade das enzimas mieloperoxidase (Pinz et al., 2016), acetilcolinesterase (Pinz et al., 2018; Oliveira et al., 2022), Ca_2^+ -ATPase (Paltian et al., 2022), Mg_2^+ -ATPase e Na^+ , K^+ -ATPase (Reis et al., 2022), os níveis da molécula de adesão celular neural e da enzima de polissialiltransferase (Barth et al., 2019), níveis de colesterol, estado oxidativo (Barth et al., 2019; Vogt et al., 2018), neuroinflamação (Paltian et al., 2022), sistemas glutamatérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos (Reis et al., 2017, Silva et al., 2018; Paltian et al., 2020) e, fatores relacionados à neurogênese (Paltian et al., 2020).

1.5 DIMORFISMO SEXUAL

Dimorfismo sexual é a ocorrência de características físicas não sexuais, que diferem indivíduos do sexo masculino do sexo feminino. Portanto, pensando nas diferenças fisiológicas tanto do sexo como do sexo feminino, o nosso estudo procurou avaliar se houve diferenças dos sexos em resposta quando submetidos aos tratamentos com Hcy, 4-PSQ e Hcy associado ao 4-PSQ.

Estudos mostraram que as diferenças dos sexos em resposta à hipóxia já foram observadas em recém-nascidos humanos prematuros e em roedores nos períodos pré e pós-natal (Burnsed et al., 2015 apud Fabres, 2020).

Estudos mais recentes com humanos e animais adultos indicam que o sexo pode ser um modulador da morte de células isquêmicas cerebrais: existe evidências de que tanto a vulnerabilidade para o dano cerebral hipóxia-isquemia (HI) quanto os mecanismos de morte celular após a HI diferem entre os sexos (Netto et al., 2017 apud Fabres, 2020).

Além disso, estudos experimentais com animais de ambos os sexos descreveram diferenças no metabolismo basal, na expressão e atividade das enzimas mitocondriais (Brekke

et al., 2017; Dukhande et al., 2009 apud Fabres, 2020), com as fêmeas apresentando maior atividade de transporte de elétrons mitocondrial do que os machos (Weis et al., 2012 apud Fabres, 2020).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Sabendo que o aumento de Hcy no organismo pode ser neurotóxica e pode causar dano oxidativo e deficiência intelectual, que reflete no déficit no desenvolvimento cognitivo de indivíduos nos primeiros anos de vida e considerando que o 4-PSQ tem atividades antioxidantes a nossa hipótese é de que o composto possa ser considerado promissor para prevenir os danos causados pela Hcy em ratos submetidos ao modelo experimental de HHCY severa aguda. Portanto, acreditamos ser importante avaliarmos os mecanismos envolvidos nas alterações oxidativas no cérebro de ratos machos e fêmeas, ocasionados pela toxicidade da Hcy e pela neuroproteção do 4-PSQ e diante de alterações, se estas possam estar associadas com diferenças sexo-dependentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor do composto 4-PSQ, sobre o status oxidativo no córtex total hipocampo de ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo experimental de HHCY aguda severa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar parâmetros de estresse oxidativo: níveis de nitritos, níveis de espécies reativas (oxidação do DCFH) e atividade das enzimas CAT, SOD e GPx em córtex e hipocampo de ratos (machos e fêmeas) submetidos à HHCY severa;
- 2 Investigar o papel neuroprotetor do 4-PSQ sobre os possíveis danos oxidativos causados pela HHCY severa em ambos os sexos.

PARTE II

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para sua avaliação. Nosso projeto seguiu todas as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – Lei 11.794, sendo os experimentos realizados de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals do National Institutes of Health (NIH). Todos os animais foram mantidos em condições adequadas, manuseados e tratados com seriedade e respeito. Além disso, os experimentos propostos no projeto estão bem descritos na literatura e são amplamente utilizados pela comunidade científica.

4.2 ANIMAIS

Os animais chegaram no biotério de experimentação com 10 a 12 dias de vida, de ambos os sexos, juntamente com as suas progenitoras. As ninhadas foram padronizadas com 4 ratos machos e 4 fêmeas. Os animais foram acomodados em caixas (dimensões: 40x30x16cm) com o fundo coberto com maravalha a qual foi trocada de acordo com a rotina do biotério. Conforme a NR 15 do CONCEA, as grades utilizadas nas caixas dos animais asseguraram a altura mínima de 17,8 cm.

Os animais foram mantidos em ambiente silencioso, climatizado ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclos de 12 horas de período diurno e 12 horas de período noturno, com água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às novas instalações e também à equipe antes de seu uso no projeto (Diretriz normativa número 12 do CONCEA).

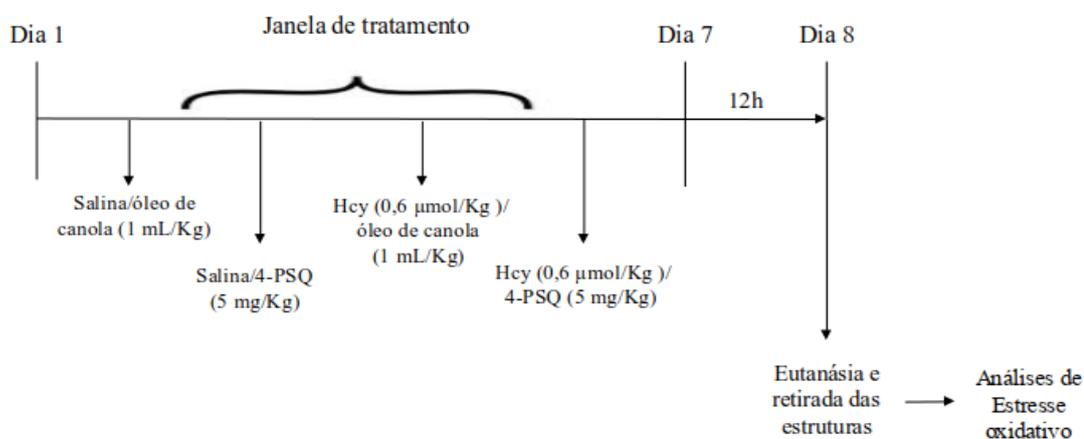
O número total de animais utilizados no trabalho foi inferior ao aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animal (CEUA) e o Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas

da Saúde (COMPESQ-ICBS) da UFRGS, sob # 43.687/2023, porque este trabalho utilizou experimentalmente o mesmo animal em algumas análises, de acordo com as diretrizes do “reusar, reduzir e reciclar”, um total de 123 animais. O ANEXO I mostra a carta de aprovação do CEUA/UFRGS.

4.2.1 Modelo experimental agudo de Hiper-homocisteinemia severa aguda

Ratos Wistar de 21 dias, de ambos os sexos receberam Hcy (0,6 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal), duas vezes ao dia, por 7 dias, através da administração subcutânea, que elevavam as concentrações plasmáticas de Hcy para cerca de 500 μM . O grupo controle pela via subcutânea recebeu solução salina. Tanto o composto 4-PSQ (5 mg/Kg) como o veículo óleo de canola (1 mL/kg) foram administrados uma vez ao dia, após 30 minutos da administração de Hcy, por gavagem de acordo com (Barth, 2019; Luchese et al., 2019; Rodrigues et al., 2021). Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) grupo controle solução salina/óleo de canola; 2) salina/4-PSQ; 3) Hcy/óleo de canola; 4) Hcy/4-PSQ. Os ratos foram eutanasiados 12h após o término do tratamento e as seguintes estruturas foram removidas: cérebro (córtex e hipocampo), conforme figura 2.

Figura 2 - Delineamento Experimental



Fonte: Autora (2024).

4.3 PREPARAÇÃO DE TECIDO

O córtex total e o hipocampo foram homogeneizados separadamente (1:10, p/v) em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) com KCl 140 mM. Os homogenatos foram centrifugados (3000 × RPM por 10 min a 4°C) para descartar o núcleo e os detritos celulares. O pellet foi descartado e o sobrenadante retirado para os ensaios bioquímicos.

4.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

A produção de espécies (ROS) no córtex cerebral e hipocampo foram determinadas, de acordo com o método LeBel (LeBel et al., 1992). A técnica consiste na oxidação do 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). As amostras foram incubadas em meio contendo 100 µM de H₂DCF-DA. A reação produz um composto fluorescente, diclorofluoresceína (DCF), que foi determinado em 488 nm de excitação e 525 nm de emissão. Os dados foram representados graficamente como nM DCF por miligrama de proteína.

4.5 NÍVEIS DE NITRITOS

Os níveis de nitritos foram medidos usando a reação de Griess. O sobrenadante do córtex cerebral e hipocampo foram misturados com reagente de Griess (1:1 mistura de 1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de naftiletlenodiamina em água) e incubados em placas de 96 poços por 10 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 543 nm. A concentração de nitrito foi calculada usando padrões de nitrito de sódio (Green et al., 1982).

4.6 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de Marklund (Marklund, 1985). A análise da SOD foi baseada na técnica da capacidade auto-oxidante de pirogalol, um processo altamente dependente de superóxido que é um substrato para SOD. A inibição da auto-oxidação do pirogalol acontece na presença de SOD. As amostras foram misturadas com EDTA 1 mM, Tris 50 mM, 80 U/mL CAT e pirogalol 0,8 mM. A atividade SOD foi indiretamente medido em 420 nm. Os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína.

4.7 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT), foi realizada, conforme Aebi (Aebi, 1984). A análise CAT foi baseada na medida da diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio em 240 nm. As amostras foram incubadas em solução contendo 20 mM peróxido de hidrogênio, 0,1% de Triton X-100 e 10 mM de potássio fosfato, pH 7,4. Uma unidade CAT foi definida como peróxido de hidrogênio 1 μ M consumido por minuto. A atividade foi expressa em unidades por miligramas de proteína.

4.8 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A atividade da glutaciona peroxidase (GPx) foi medida pelo método de Wendel (Wendel, 1981). As amostras de córtex cerebral e hipocampo foram misturadas em meio contendo 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de glutaciona redutase, 0,4 mM azida, terc-butil-hidroperóxido 0,5 mM e nicotinamida 0,1 mM adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). O decaimento do NADPH foi monitorado em 340 nm. Uma unidade GPx foi definida como 1 μ M de NADPH consumido por minuto. A atividade da GPx foi expressa em unidades por

miligramas de proteína.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

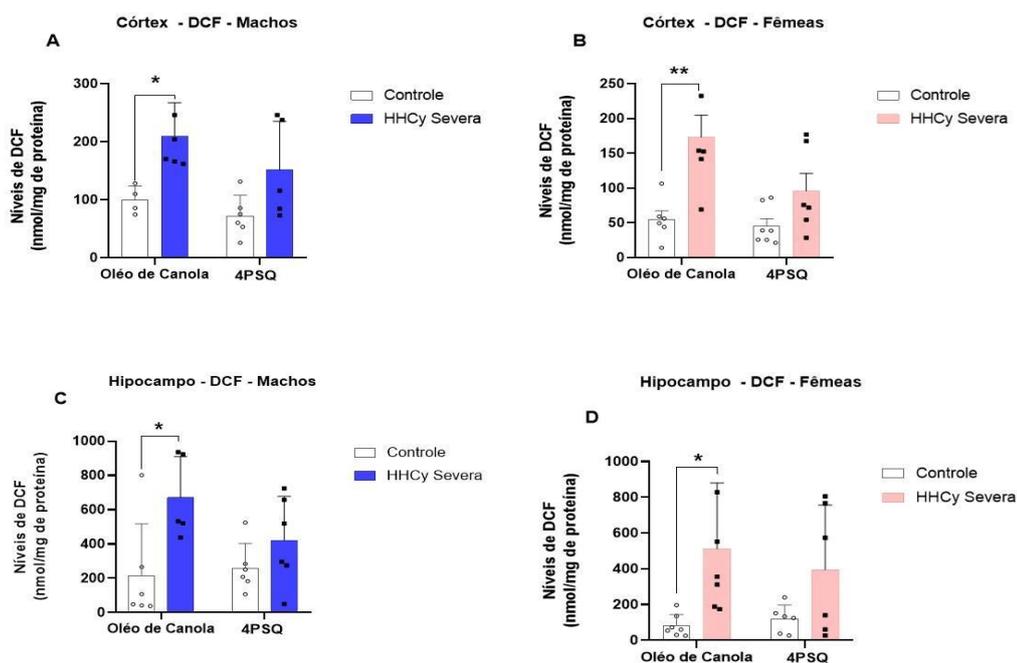
A análise estatística foi realizada pelos métodos estatísticos ANOVA de duas vias, seguida pelo post-test de Tukey ou Sidak, conforme recomendação do teste estatístico para identificar possíveis diferenças entre os grupos amostrados. Após a avaliação se havia normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas em $*p < 0,05$ e os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão (DP). Todas as análises foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 8.0.1 (LA Jolla, CA, EUA).

PARTE III

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (DCFH)

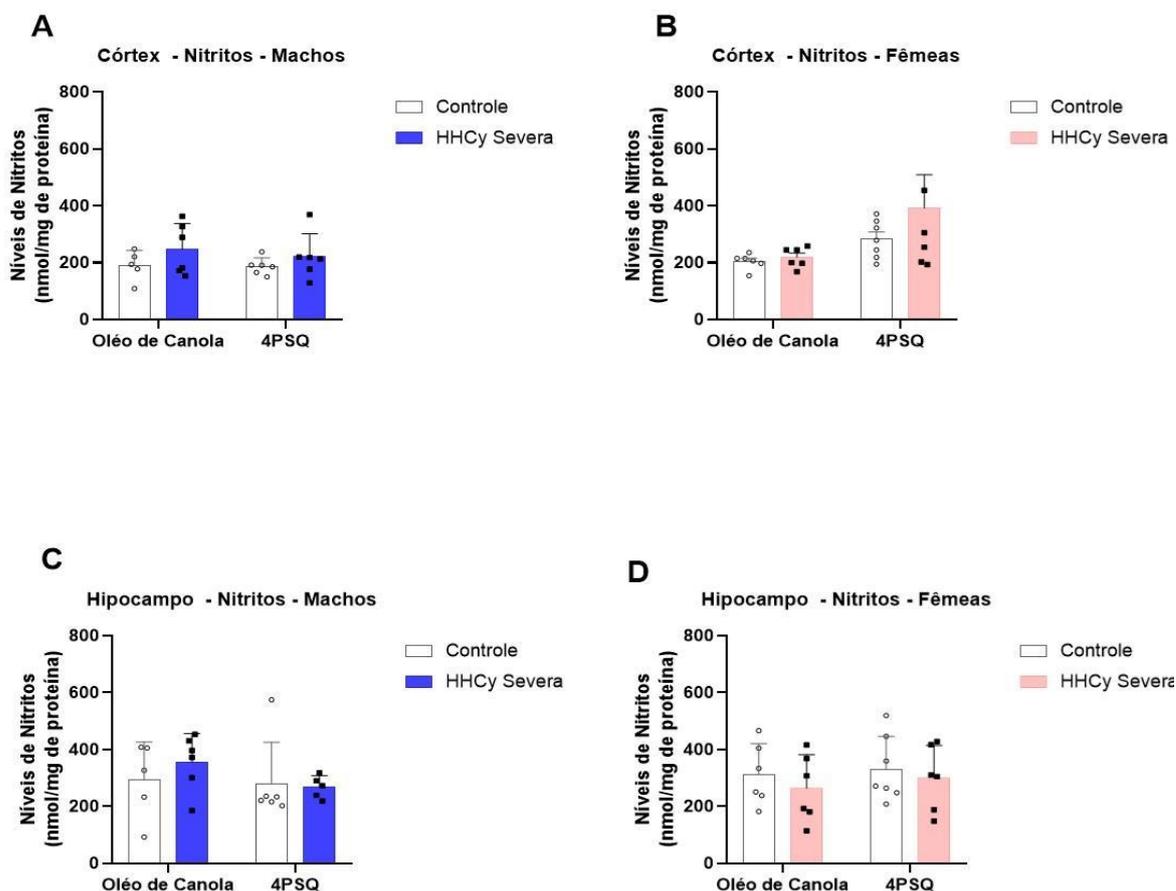
A análise de variância (ANOVA) de duas vias indicou um aumento significativo na produção de espécies reativas no córtex cerebral de machos [F(1,17) = 3,767; p = 0,0437, Figura 3A] e das fêmeas [F(1,21) = 2,634; p = 0,0048 (Figura 3B)] e no hipocampo de ratos machos [F(1,19) = 2,082; p = 0,0283 (Figura 3C)] e fêmeas [F(1,22) = 0,5463; p = 0,034, (Figura 3D)] submetidos à hiper-homocisteinemia severa aguda (HHCY) em comparação aos demais grupos. Os resultados também mostraram que o tratamento com 4-PSQ *per se* ou combinado com HHCy não alteraram a produção de espécies reativas em nenhum dos grupos analisados (p > 0,05), mostrando que o composto reverteu o aumento das espécies reativas de oxigênio causados pela HHCY, quando comparado com os grupos tratados com Hcy.



Legenda: Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em córtex de ratos [machos (A) e fêmeas (B)] e no hipocampo de ratos [machos (C) e fêmeas (D)] sobre os níveis de DCF. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 6 animais por grupo. Diferença para comparação entre animais tratado com HHCY em relação ao controle* (p < 0,05).

5.2 NÍVEIS DE NITRITOS

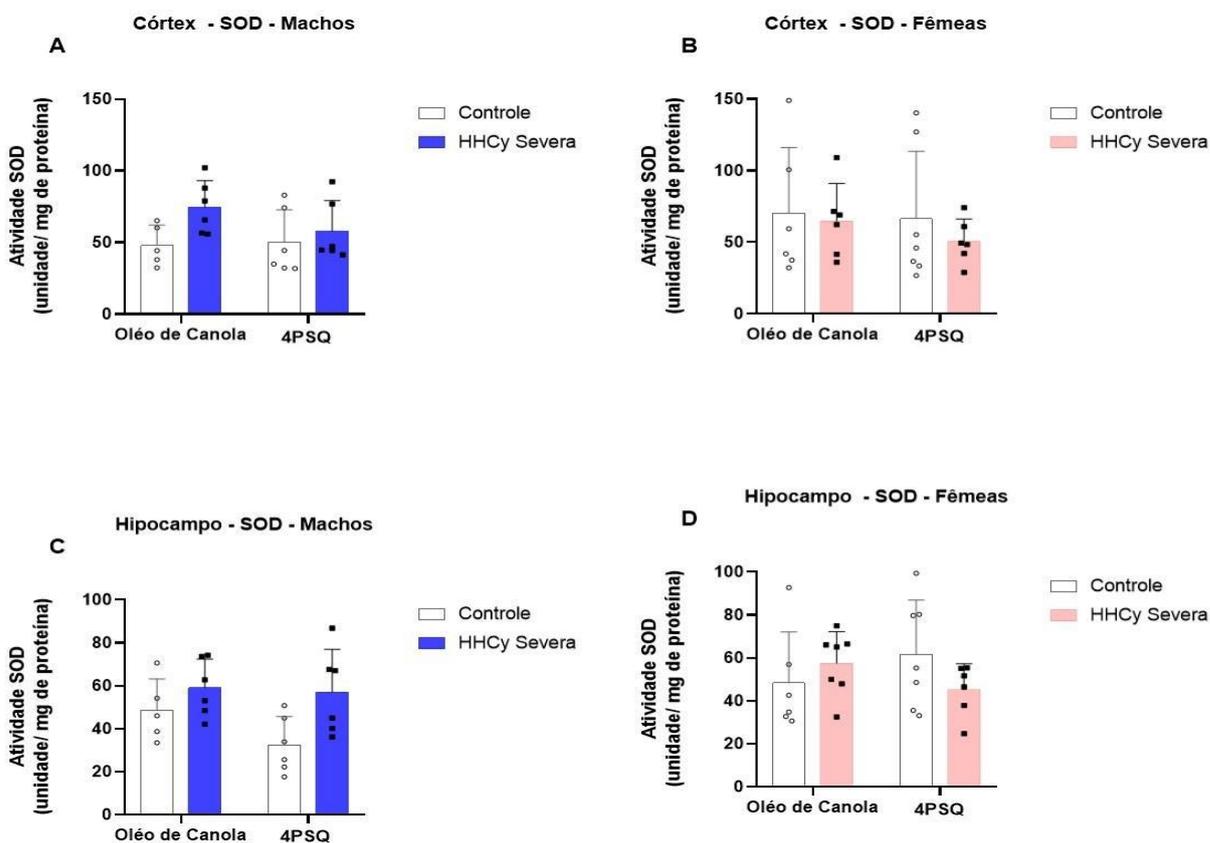
Os níveis de nitritos não foram alterados significativamente no córtex cerebral (machos [F(1,18) = 1,345; p = 0,249, Figura 7A] e fêmeas [F(1,20) = 0,768; p = 0,403], Figura 7B) e no hipocampo (machos [F(1,19) = 1,218; p = 0,278, Figura 7C] e fêmeas [F(1,21) = 0,893; p = 0,367], Figura 7D) de ratos tratados com HHCY em relação aos controles. O tratamento com 4-PSQ *per se* ou associado à HHCy não revelou diferenças estatisticamente significativas em comparação aos grupos controles (p > 0,05).



Legenda: Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e 7-cloro-4- (fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em córtex de ratos [machos (A) e fêmeas (B)] e no hipocampo de ratos [machos (C) e fêmeas (D)] sobre os níveis de nitrito. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 6 animais por grupo. Não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados (p > 0,05).

5.3 ATIVIDADE DA ENZIMA SOD

Os resultados mostraram que não houve alterações significativas na atividade da SOD em córtex cerebral ratos machos [F(1,18) = 1,231; p = 0,267, Figura 4A] e fêmeas [F(1,20) = 0,874; p = 0,392, Figura 4B] submetidos ao modelo de HHcy. De forma similar, no hipocampo, tanto machos [F(1,19) = 1,102; p = 0,315, Figura 4C] quanto fêmeas [F(1,21) = 0,945; p = 0,367, Figura 4D] não apresentaram diferença significativa entre os grupos (p > 0,05). O tratamento com 4-PSQ *per se* ou associado à HHcy não alterou a atividade da enzima (p > 0,05).



Legenda: Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHcy) e 7-cloro-4- (fenilselanyl) quinolina (4-PSQ) em córtex de ratos [machos (A) e fêmeas (B)] e no hipocampo de ratos [machos (C) e fêmeas (D)] sobre a atividade da enzima superóxido Dismutase. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 6 animais por grupo. Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados (p > 0,05).

5.4 ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE

Os resultados mostraram que embora o tratamento com a Hcy apresentou uma tendência de diminuição da enzima catalase, os dados estatísticos não foram alterados significativamente. No entanto, observou-se que houve um aumento significativo da enzima no córtex cerebral de ratos machos submetidos à HHcy severa em comparação aos ratos tratados com 4-PSQ associados à HHcy [F(1,19) = 6,682; p = 0,0329, Figura 5A]. Em relação às demais estruturas, não foram identificadas diferenças significativas no córtex cerebral de ratas fêmeas [F(1,20) = 0,752; p = 0,409, Figura 5B], nem no hipocampo de machos [F(1,18) = 1,048; p = 0,329, Figura 5C] e fêmeas [F(1,21) = 0,829; p = 0,378, Figura 5D]. O tratamento com 4-PSQ *per se* ou associados à HHcy no hipocampo de machos e fêmeas e no córtex de fêmeas não foi diferente dos demais grupos (p > 0,05).

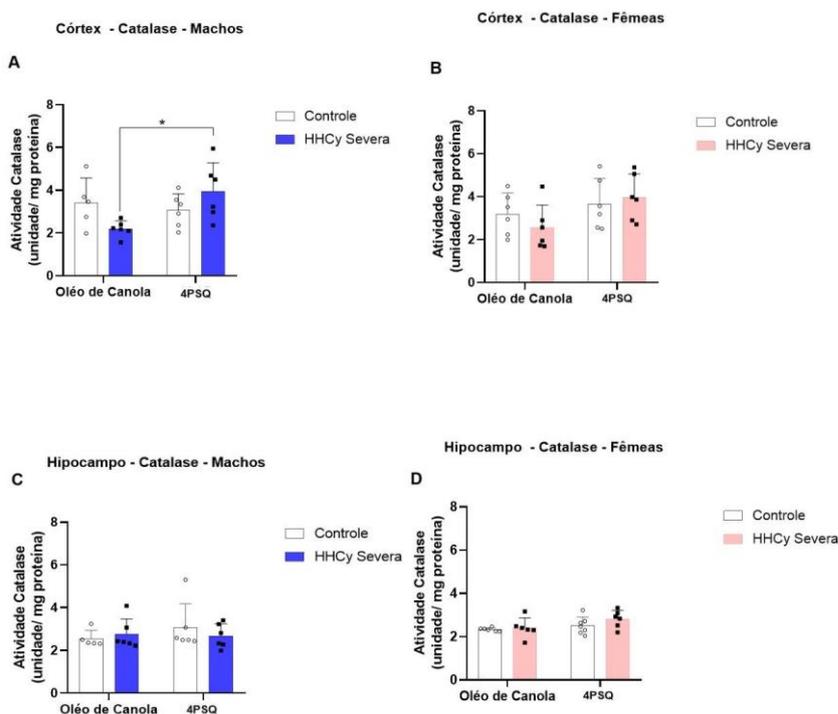
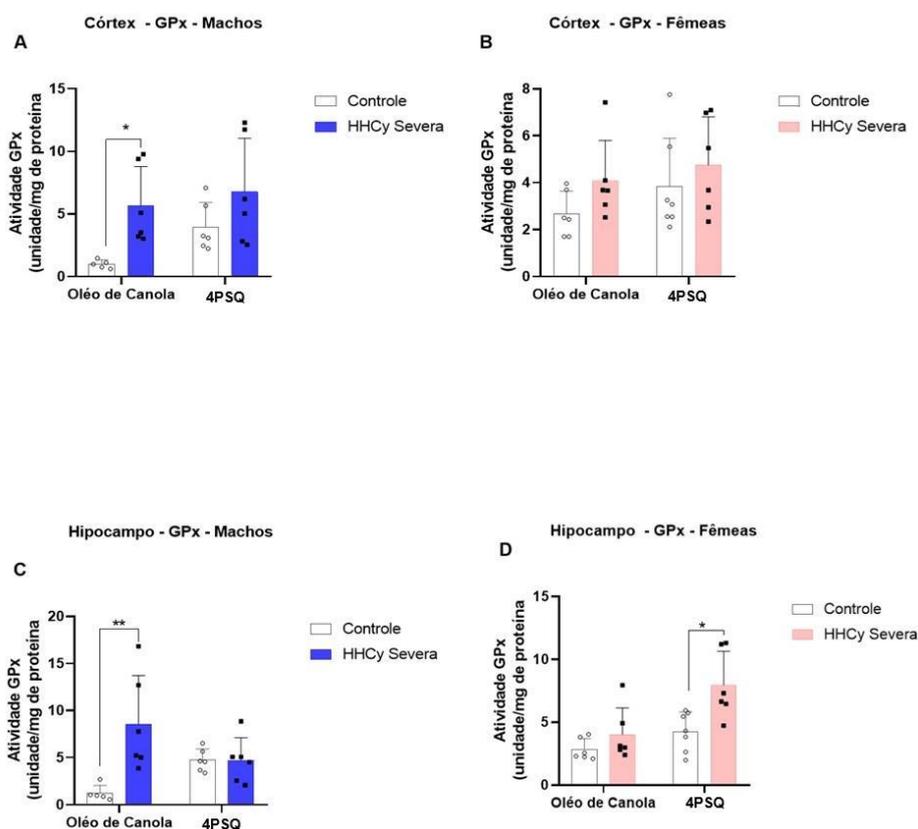


Figura 5: Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHcy) e 7-cloro-4- (fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em córtex de ratos [machos (A) e fêmeas (B)] e no hipocampo de ratos [machos (C) e fêmeas (D)] sobre a atividade da enzima catalase. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 6 animais por grupo. Diferença para comparação entre animais tratado com HHcy e HHcy+4-PSQ * (p < 0,05).

5.5 ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

O tratamento com HHcy aumentou significativamente a atividade da enzima (GPx) tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo de ratos machos, em comparação aos grupos controle [F(1,19) = 8,688; p = 0,0041, Figura 6A e 6C]. A HHcy não alterou a atividade da enzima nas ratas fêmeas em relação ao controle [F(1,20) = 0,923; p = 0,357, Figura 6B (p>0,05)]. O 4-PSQ *per se* não alterou a atividade de enzimas em nenhuma estrutura estudada (p>0,05), mas houve diferença significativa entre a atividade da GPx no hipocampo de ratas fêmeas tratadas com 4-PSQ em relação à combinação da 4-PSQ mais Hcy [F(1,21) = 2,605; p = 0,0144, Figura 6D].



Legenda: Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e 7-cloro-4- (fenilselanyl) quinolina (4-PSQ) em córtex de ratos [machos (A) e fêmeas (B)] e no hipocampo de ratos [machos (C) e fêmeas (D)] sobre a atividade da enzima glutationa peroxidase. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para 6 animais por grupo. Diferença para comparação entre animais tratado com HHCY+Óleo de canola e HHCY+4-PSQ em relação aos seus respectivos grupos controle * (p < 0,05).

6 DISCUSSÃO

A homocistinúria (HCU) clássica é um erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos sulfurados, associado à deficiência da enzima CBS. Pacientes afetados apresentam alterações vasculares, cognitivas e motora, cujos mecanismos ainda não estão completamente entendidos. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental crônico de HCU em ratos neonatos e mostrou uma indução do estresse oxidativo em cérebro e coração dos animais tratados com Hcy, com aumento na produção de espécies reativas e na peroxidação lipídica e diminuição nas defesas antioxidantes e nos níveis de nitritos e em coração de ratos machos jovens submetidos (Kolling et al., 2011; Cunha et al., 2012).

O 4-PSQ, por ser um novo derivado da quinolina contendo selênio, apresenta propriedades farmacológicas, como efeito antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório (Reis et al., 2017). O efeito antioxidante do 4-PSQ, pode reparar o desequilíbrio redox, causado pelo envelhecimento, e contribuir para a sua restauração do equilíbrio redox (Luchese et al., 2020).

O selênio, um elemento essencial para os mamíferos sendo oriundo da dieta, possui funções fisiológicas como componente estrutural de diversas enzimas antioxidantes, participação em vias metabólicas, incluindo o metabolismo dos hormônios tireoidianos e função imunológica (Nogueira; Rocha, 2011). De acordo com isso, os compostos organoselênio ganharam a atenção dos pesquisadores devido ao seu grande potencial farmacológico (Nogueira et al., 2004; Nogueira; Rocha, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito protetor do composto 4-PSQ sobre o status oxidativo, em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo experimental de HHCY aguda severa. Sabe-se que em muitos processos fisiológicos e patológicos do sistema nervoso central, os mesmos expressam dimorfismo sexual, mais precisamente em relação à

propensão por um gênero ou uma resposta sexo-específica para um determinado tratamento que também podem ser encontradas quando são avaliados efeitos de estratégias neuroprotetoras (Weis, 2012).

Os resultados mostraram um aumento significativo na produção de espécies reativas no córtex cerebral tanto de ratos machos quanto de fêmeas tratados com Hcy, quando comparado com os grupos controles. No córtex de machos e fêmeas tratados com 4-PSQ, foi observado que o composto sozinho ou junto com HHCY não alterou a produção de espécies reativas em nenhum dos grupos analisados, evidenciando que o 4-PSQ reverteu o aumento das espécies reativas de oxigênio causados pela Hcy.

No hipocampo, tanto de ratos machos e fêmeas tratados com HHCY, os resultados mostraram que também houve um aumento significativo na produção de espécies reativas, quando comparado com os grupos controles. De mesmo modo, nos grupos tratados com 4-PSQ, foi notado que o composto *per se* ou combinado com HHCy não alterou a produção de espécies reativas nos grupos analisados, mostrando que o 4-PSQ conseguiu reverter o aumento das espécies reativas de oxigênio causados pela HHCY. De acordo, com os resultados obtidos não houve diferença significativa na atividade da enzima SOD em resposta sexo-específica na presença de Hcy, 4-PSQ e 4-PSQ combinado à Hcy.

Portanto, os resultados mostraram que o modelo de HHCY aguda aumentou a produção de espécies reativas. Este aumento pode ser devido ao fato de que a Hcy atuar indiretamente através de sua auto-oxidação formando espécies reativas de oxigênio, como sugerido em estudos anteriores (Mansoor et al., 1995; Loscalzo, 1996; Jacobsen, 1998). Outro resultado observado foi a diferença nos níveis basais de ROS entre machos e fêmeas no córtex cerebral, quando comparado com os níveis basais dos grupos controles. Enquanto no córtex dos machos controles os níveis estão por volta de 100 nmol/mg de proteína, e nas fêmeas o valor

apresentado é a metade, cerca de 50 nmol/mg de proteína.

Os resultados mostraram que os níveis de nitritos não foram alterados significativamente no córtex cerebral, assim como no hipocampo de ratos machos e fêmeas, tratados com HHCY em relação aos grupos controles. O tratamento com 4-PSQ sozinho ou junto à HHCy, também não revelou diferenças estatisticamente significativas tanto no córtex cerebral como no hipocampo de ratos machos e fêmeas em comparação aos grupos controles. Não houve uma resposta sexo-específica para determinar um aumento nos níveis de nitritos.

O tratamento com Hcy não alterou os níveis de nitritos e o 4-PSQ não alterou os níveis de nitritos. Os níveis de nitritos estando corretos tem funções fisiológicas e de sinalização importantes. Provavelmente as espécies reativas são um dos principais responsáveis pela diminuição nos níveis de NO em pacientes com hiper-homocisteinemia (Karolczak; Olan, 2009 apud Cunha, 2012).

Quanto às atividades de enzimas antioxidantes, os resultados mostraram que animais (fêmeas submetidas) ao modelo de HHCY não apresentaram alterações significativas na atividade da enzima SOD em córtex cerebral, em comparação aos grupos controles. Do mesmo modo, foi observado que no hipocampo, tanto de ratos machos quanto fêmeas, também não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Foi constatado que os grupos tratados com 4-PSQ sozinho ou junto à HHCY não alteraram a atividade da enzima SOD. De acordo, com os resultados obtidos não houve diferença significativa na atividade da enzima SOD em resposta sexo-específica na presença de Hcy, 4-PSQ e 4-PSQ combinado à Hcy.

A SOD atua sobre o radical $O^{2\cdot-}$ fazendo a sua dismutação em uma molécula de H_2O_2 , que no processo para manter o equilíbrio entre as atividades coordenadas da SOD com as enzimas CAT e GPX, o H_2O_2 é decomposto por elas, dessa forma as enzimas garantem detoxificação de espécies reativas, processo muito importante para manter a integridade das

biomoléculas (Kolling, 2015). Conforme, os resultados obtidos não houve diferença significativa na atividade da enzima em resposta sexo-específica na presença de Hcy, 4-PSQ e 4-PSQ combinado à Hcy.

O tratamento com a Hcy não alterou significativamente a CAT em relação ao controle, mas apresentou uma tendência em diminuir a atividade desta CAT. Contudo, foi observado que houve um aumento significativo da atividade da enzima no córtex cerebral de ratos machos submetidos ao modelo de HHCY aguda severa em comparação aos ratos tratados com 4-PSQ junto à HHCY. O tratamento com 4-PSQ *per se* ou combinado à HHCY no córtex cerebral de ratas fêmeas e no hipocampo de ratos machos e fêmeas, não apresentaram resultados diferentes, quando comparados aos grupos controle, sugerindo que o efeito antioxidante do 4-PSQ, não foi suficiente para reverter a atividade da enzima CAT. Portanto, quando analisamos os resultados obtidos, verificamos que houve resposta sexo-específica no córtex cerebral de ratos machos submetidos à HHCY severa em comparação aos ratos tratados com 4-PSQ associados à HHCY.

Sabendo que estas enzimas apresentam funções importantes capazes de reverter espécies reativas em seus derivados inativos. Conforme, Cunha (2012) foi observado no estudo realizado, que a diminuição da SOD possa ter sido resultado de um acúmulo de $O_2^{\cdot-}$, e isto pode ter sido responsável em estimular o aumento da atividade da enzima CAT, no córtex cerebral de ratos machos, porque a CAT atua na sequência no processo da via de eliminação de espécies reativas de oxigênio.

Outra hipótese para que não houvesse alteração na atividade enzimática da SOD em nenhuma estrutura estudada e da enzima CAT, no córtex cerebral de ratas fêmeas e no hipocampo de ratos machos e fêmeas, pode estar associada pelo acúmulo de espécies reativas, como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , que inibem a atividade da enzima, por serem tóxicos, de modo a induzir

danos às biomoléculas (Vessey; Lee, 1993 apud Cunha, 2012), e que pode levar a formação de OH^- (Kolling, 2015), ou a diminuição pode ter sido causada pela Hcy, que regula a expressão de genes e o *turnover* proteico, incluindo as enzimas antioxidantes (Stern et al., 2004; Sharma et al., 2006 apud Schweinberger, 2013), não podemos descartar que as mudanças na atividade da SOD e da CAT sejam causadas por esses mecanismos (Schweinberger, 2013).

Resultados também mostraram que a HHCY aumentou significativamente a atividade da enzima da GPx tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo de ratos machos, em comparação aos grupos controle. Entretanto, o modelo de HHCY não alterou a atividade da GPx, no córtex cerebral de ratas fêmeas em relação aos grupos controle. No entanto, no hipocampo das ratas fêmeas foi observado uma diferença significativa na atividade da GPx, nos grupos tratados com 4-PSQ em comparação a combinação do 4-PSQ associado à Hcy. Contudo, no córtex cerebral de ratos machos e fêmeas, assim como no hipocampo de ratos machos, o 4-PSQ *per se* ou combinado com Hcy, não foi capaz de reverter a atividade da enzima GPx.

O estudo mostrou que diante da administração de Hcy, no córtex cerebral e no hipocampo de ratos machos, houve um aumento significativo na atividade da GPx. Este aumento pode estar relacionado na tentativa da GPx, de tentar restaurar a atividade da enzima CAT ou de eliminar as espécies reativas produzidas diante do tratamento, quando comparado com os grupos controle. Os resultados mostraram que houve atividade da GPx no hipocampo de ratas fêmeas na presença do 4-PSQ junto com Hcy, quando comparada com os grupos controles que foram tratados somente com o 4-PSQ.

Os resultados obtidos no córtex cerebral e no hipocampo de ratos machos tratados com Hcy apresentaram resposta sexo-específico, assim como no hipocampo de ratas fêmeas tratadas com 4-PSQ combinado com Hcy. O aumento da GPx pode estar associado com a

função que esta enzima possui por ser responsável pela redução dos níveis de H_2O_2 . Quando os níveis de H_2O_2 estão altos a GPx é responsável pela sua redução, mas quando estão relativamente baixos a enzima responsável pela sua redução é a CAT (Ramires Junior, 2023).

A GPx (Ramires Junior, 2023), atua principalmente nas mitocôndrias, pois essas organelas não possuem a enzima catalase, para ajudar na redução de H_2O_2 , além de catalisar a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH em GSSG, e protege as células dos danos causados pelas espécies reativas (Shan; Aw; Jones, 1990 apud Ferreira, 2012) a GPx também promove a degradação de peróxidos lipídicos (Ramires Junior, 2023).

Os resultados obtidos nas análises realizadas para avaliar a atividade das enzimas SOD e CAT sugerem que não houve um aumento na expressão do fator nuclear relacionado ao eritroide 2 (Nrf2) que é responsável pela resposta antioxidante das células (Ma, 2013; Zhang; Zheng, 2015), e também é importante no controle de muitos genes que protegem as células contra muitos danos, além de ser um regulador da resistência celular a oxidantes e na expressão das enzimas antioxidantes (Sabouny et al., 2017; Tonelli et al., 2017), sugerindo que não houve um aumento significativo das espécies reativas, e com isso, não houve necessidade de um aumento na sua expressão.

No nosso estudo foi observado uma relação à propensão por um gênero ou uma resposta sexo-específica para um determinado tratamento e estrutura. Os resultados mostraram que houve uma alteração em alguns resultados obtidos, em relação a toxicidade da Hcy e pela ação antioxidante do 4-PSQ combinado ao Hcy, portanto houve diferenças em relação ao dimorfismo sexual.

Quando o Nrf2 citosólico se transloca para o núcleo, ele se liga aos elementos de resposta antioxidante, ativando a transcrição de enzimas antioxidantes, como GPx, SOD e CAT

(Santos et al., 2019). Portanto, um aumento da expressão de Nrf2 é importante para regular a homeostase redox em doenças neurodegenerativas (Santos et al., 2019). O que os nossos resultados demonstram que talvez não houve translocação do Nrf2 para o núcleo, porque a toxicidade da Hcy, não foi significativa para aumentar em excesso a produção de espécies reativas, a ponto do Nrf2 ativar a transcrição de enzimas antioxidantes como a SOD CAT, talvez porque tenha sido modulado pela Hcy.

Quanto ao dimorfismo sexual no nosso estudo, foi observado uma relação à propensão por um gênero ou uma resposta sexo-específica para um determinado tratamento e estrutura. Os resultados mostraram que houve uma alteração em alguns resultados obtidos, em relação a toxicidade da Hcy e pela ação antioxidante do 4-PSQ combinado ao Hcy, portanto houve diferenças em relação ao dimorfismo sexual.

Considera-se, a partir dos resultados obtidos, que o composto 4-PSQ tenha efeito antioxidante sobre os danos causados pela hiper-homocisteinemia severa (HHCY), o qual foi mostrado pela reversão do aumento das espécies reativas de oxigênio causadas pela HHCY e por tentar recuperar as enzimas antioxidantes (CAT e GPx) em um ambiente oxidante. O estudo também mostrou que o efeito sobre as enzimas é sexo-dependente. Acresce-se que o 4-PSQ por apresentar na sua composição o elemento químico selênio pode ser responsável pela propriedade farmacológica antioxidante. Com isso mais estudos devem ser realizados para assegurar que o 4-PSQ seja um possível tratamento promissor em estudos pré-clínicos e clínicos.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que ratos submetidos à hiper-homocisteinemia severa aguda causaram os seguintes resultados:

1) Aumento das espécies reativas de oxigênio (DCF) em córtex e hipocampo de ratos machos e fêmeas e que o 4-PSQ *per se* não teve efeito, mas reverteu tal efeito.

2) Com relação às enzimas antioxidantes, a SOD não foi alterada pela HHCy em nenhuma estrutura de machos e fêmeas. A atividade da CAT não foi alterada pela HHCy, mas quando a Hcy foi associada ao 4-PSQ a atividade da enzima aumentou em córtex de ratos machos.

A atividade da GPx aumentou em córtex e hipocampo de ratos machos com HHCy. Em hipocampo de fêmeas, mas não no córtex, houve um aumento da atividade da GPx no grupo tratado com Hcy combinado com 4-PSQ em comparação ao grupo 4-PSQ.

3) Os níveis de nitritos não foram alterados pela HHCy e demais grupos.

A partir dos resultados obtidos, observamos que o composto 4-PSQ tem um potencial efeito antioxidante (DCF) que talvez possa estar relacionado com a presença de um átomo de selênio na sua composição. Observa-se que este composto parece ter efeito de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes, CAT e GPx, de maneira sexo-dependente na presença da HHCy severa aguda. Portanto, se faz necessário ampliar os estudos sobre o efeito antioxidante do 4-PSQ em relação aos danos causados pela HHCY e outras substâncias com efeito oxidante.

8 PERSPECTIVAS

Avaliar os seguintes parâmetros em ratos machos e fêmeas de 21 de idade submetidos à hiper-homocisteinemia crônica severa experimental em tecido cerebral, cardíaco e muscular:

- Avaliar os efeitos protetores do 4-PSQ;
- Níveis de Hcy;
- A morfologia dos tecidos listados acima por microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e de estresse oxidativo (medida de ERs, atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx).

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Métodos Enzym**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- AL-MEHDI, A. B.; SHUMAN, H.; FISHER, A. B. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. **Am J Physiol.**, v. 272, p. 294-300, 1997.
- BARTH, A.; VOGT, A. G.; REIS, A. S.; PINZ, M. P.; KRÜGER, R.; DOMINGUES, W. B.; ALVES, D.; CAMPOS, V. F.; PINTON, S.; PAROUL, N.; WILHELM, E. A.; LUCHESE, C. 7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels. **Molecular Neurobiology**, p. 1-11, 2019.
- BREKKE, E.; BERGER, H. R.; WIDERØE, M.; SONNEWALD, U.; MORKEN, T. S., Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte–Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rat. **Neurochem. Res.**, v. 42, p. 115–32, 2017.
- BURNSIED, J. C.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; HOSSAIN, M. S.; KESAVAN, K.; MARTIN, L. J.; ZHANG, J.; NORTHINGTON, F. J. Hypoxia-ischemia and therapeutic hypothermia in the neonatal mouse brain - A longitudinal study. **PLoS One**, v. 10, p. 1-20, 2015.
- CUNHA, A. A. da; SCHERER, E.; CUNHA, M. J. da; SCHMITZ, F.; MACHADO, F. R.; LIMA, D. D.; DELWING, D.; WYSE, A T. S. Acute hyperhomocysteinemia alters the coagulation system and oxidative status in the blood of rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 360, p. 205-214, 2011.
- CUNHA, A. A. da. **Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo experimental de hiper-homocisteinemia severa**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- DUKHANDE, V. V.; ISAAC, A. O.; CHATTERJI, T.; LAI, J. C. K. Reduced glutathione regenerating enzymes undergo developmental decline and sexual dimorphism in the rat cerebral cortex. **Brain Res.**, v. 1286, p. 19-24, 2009.
- FABRES, R. B. **Efeitos da administração de progesterona e da hipotermia terapêutica sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o comportamento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia neonatal**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2020.
- FERREIRA, M. C. F. **Efeito do acetato de chumbo associado ou não ao sulfato ferroso em cérebro de ratos: análise das enzimas antioxidantes** 2012. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Universidade de São Paulo, Bauru, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131–138, 1982.

JACOBSEN, D. W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1833-1843, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 32, p. 125-30, 2011.

HALLIWELL, B.; CHEAH, I. K., TANG, R.M.Y. Ergothioneine – a diet-derived antioxidant with therapeutic potential. **FEBS Letters**, v. 592, n. 20, p. 3357–3366, 2018.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.

KAROLCZAK, K.; OLAS, B. Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system. **Physiol Res.**, v. 58, p. 623-633, 2009.

KIM, J.; KIM, H.; ROH, H.; KWON, Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. **Archives of Pharmacol Research**, v. 41, n. 4, p. 372–383, 2018.

KIRKHAM, P. A.; CARAMORI, G.; CASOLARI, P.; PAPI, A.; EDWARDS, M.; SHAMJI, B.; TRIANTAPHYLLOPOULOS, K.; HUSSAIN, F.; PINART, M.; KHAN, Y.; HEINEMANN, L.; STEVENS, L.; YEADON M.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of COPD. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 187, p. 796-802, 2011.

KOLLING, J.; SCHERER, E. B.; CUNHA, A. A. da; CUNHA, M. J.; WYSE, A. T. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. **Cardiovasc Toxicol.**, v. 11, p. 67-73, 2011.

KOLLING, J. **Alterações musculares e cerebrais em ratos jovens submetidos ao modelo experimental de hiperhomocisteinemia severa: Papel protetor da creatina**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

LEBEL, C. P.; ALI, S. F.; MCKEE, M. Evaluation of the probe 2'7'- dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 104, n. 2, p. 17-24, 1992.

LEMOS, B. B.; MOTTA, K. P.; PALTIAN, J. J.; REIS, A. S.; BLÖDORN, G. B.; SOARES, M. P.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl)

quinoline in the treatment of oxaliplatin-induced hepatic toxicity in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 99, p. 378-388, 2021.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUCHESE, C.; BARTH, A.; COSTA, G. P.; ALVES, D.; NOVO, D. L. R.; MESKKO, M. F.; WILHEIM, E. A. Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-aging drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats. **Journal Pre-proof.**, 2019.

LUCHESE, C.; BARTH, A.; COSTA, G. P. da; ALVES, D.; NOVO, D. R.; MESKO, M. F.; WILHELM, E. A. Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-aging drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats. **Exp Gerontol.**, v. 130, 2020.

LOSCALZO, J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest.**, v. 98, p. 5-7, 1996.

MA, Q. Papel do Nrf2 no estresse oxidativo e toxicidade. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MANSOOR, M. A.; BERGMARK, C.; SVARDAL, A. M.; LONNING, P. E.; UELAND, P. M. **Redox status and protein binding of plasma homocyst(e)ine and other 176aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease.** 1995.

MARKLUND, S. L.; WESTMAN, N. G.; LUNDGREN, E.; ROOS, G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. **Cancer Res.**, v. 42, p. 1955-1961, 1982.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: GREENWALD, R. A. Handbook for oxygen radical research. **CRC Press**, v. 2, p. 243-247, 1985.

MATTÉ, C.; MACKEDANZ, V.; STEFANELLO, F. M.; SCHERER, E. B.; ANDREAZZA, A. C.; ZANOTTO, C.; MORO, A. M.; GARCIA, S. C.; GONCALVES, C. A.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; WYSE, A. T. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. **Neurochem Int.**, v. 54, p. 7-13, 2009a.

MATTÉ, C.; STEFANELLO, F. M.; MACKEDANZ, V.; PEDERZOLLI, C. D.; LAMERS, M. L.; DUTRA-FILHO, C. S.; SANTOS, M. F. dos; WYSE, A. T. Homocysteine Induces Oxidative Stress, Inflammatory Infiltration, Fibrosis and Reduces Glycogen/Glycoprotein Content in Liver of Rats. **Int J Dev Neurosci.**, v. 27, p. 337-344, 2009b.

MOTTA, K. P.; LEMOS, B. B.; PALTIAN, J. J.; REIS, A. S.; BLÖDORN, G. B.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 7-Chloro-4-(phenylselanyl) quinoline reduces renal oxidative stress induced by oxaliplatin in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 1, p. 1, 2021.

MUDD, S. H. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. **Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.**, v. 157, p. 33-32, 2011

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **J Bras Patol e Med Lab.**, v. 40, p. 311-320, 2004.

NETTO, C. A.; SANCHES, E.; ODORCYK, F. K. Duran-Carabali, L.E., Weis, S.N. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, p. 409-421, 2017.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, 1313-1359, 2011.

OLIVEIRA, R. L.; VOSS, G. T.; RODRIGUES, K.; PINZ, M. P.; BIONDI, J. V.; BECKER, N. P.; BLODORN, E.; DOMINGUES, W. B.; LARROZA, A.; CAMPOS, V. F.; ALVES, D.; WILHELM, E. A.; LUCHESE, C. Prospecting for a quinoline containing selenium for comorbidities depression and memory impairment induced by restriction stress in mice. **Psychopharmacology**, v. 239, p. 59-81, 2022.

PALTIAN, J. J.; REIS, A. S.; OLIVEIRA, R. L.; FONSECA, C. A. R.; DOMINGUES, W. B.; DELLAGOSTIN, E. N.; CAMPOS, V. F.; KRUGER, R.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. The anxiolytic effect of a promising quinoline containing selenium with the contribution of the serotonergic and GABAergic pathways: Modulation of parameters associated with anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 393, 2020.

PALTIAN, J. J.; REIS, A. S.; MARTINS, A. W. S.; BLÖDORN, E. B.; DELLAGOSTIN, E. N.; SOARES, L. K.; SCHUMACHER, R. F.; CAMPOS, V. F.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 7-Chloro-4-(Phenylselenyl) Quinoline Is a Novel Multitarget Therapy to Combat Peripheral Neuropathy and Comorbidities Induced by Paclitaxel in Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 59, p. 6567-6589, 2022.

PINZ, M.; REIS, A. S.; DUARTE, V.; ROCHA, M. J.; GOLDANI, B. S.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 122-128, 2016.

PINZ, M. P.; REIS, A. S. dos; VOGT, A. G.; KRÜGER, R.; ALVES, D.; JESSE, C. R.; ROMAN, S. S.; SOARES, M. P.; WILHELM, E. A.; LUCHESE, C. Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselenyl) quinoline: Prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1006-1014, 2018.

POPA-WAGNER, A.; MITRAN, S.; SIVANESAN, S.; CHANG, E.; BUGA, A. M. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. **Oxid Med Cell Longev.**, 2013.

RAMIRES JUNIOR, O. V. **Efeitos neurotóxicos da hiper-homocisteinemia leve experimental: Papel neuroprotetor do ibuprofeno e da rivastigmina.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2023.

REIS, A. S.; PINZ, M. P.; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatric Research**, n. 84, p. 191-199, 2017.

REIS, A. S.; PALTIAN, J. J.; DOMINGUES, W. B.; COSTA, G. P.; ALVES, D.; CAMPOS, V. F.; MESKO, M. F.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Advances in the understanding of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice: 7-chloro-4-(phenylselenyl) quinoline as a promising therapeutic agent. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 5219-5234, 2020a.

REIS, A. S.; PALTIAN, J. J.; DOMINGUES, W. B.; COSTA, G. P.; ALVES, D.; GIONGO, J. L.; CAMPOS, V. F.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Pharmacological modulation of Na⁺, K⁺-ATPase as a potential target for OXA-induced neurotoxicity: Correlation between anxiety and cognitive decline and beneficial effects of 7-chloro-4-(phenylselenyl) quinoline. **Brain Research Bulletin**, v. 162, p. 282-290, 2020b.

REIS, A. S.; MARTINS, C. C.; MOTTA, K. P.; PALTIAN, J. J.; COSTA, G. P.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Interface of Aging and Acute Peripheral Neuropathy Induced by Oxaliplatin in Mice: Target-Directed Approaches for Na⁺, K⁺ATPase, Oxidative Stress, and 7-Chloro-4-(phenylselenyl) quinoline Therapy. **Molecular Neurobiology**, v. 59, p. 1766-1780, 2022.

RODRIGUES, K. C.; BORTOLLATO, C. F.; MOTTA, K. P.; OLIVEIRA, R. L.; PALTIAN, J. J.; KRÜGER, R.; ROMAN, S. S.; BOEIRA, S. P.; ALVES, D.; WILHELM, E. A.; LUCHESE, C. The neurotherapeutic role of a selenium-functionalized quinoline in hypothalamic obese rats. **Psychopharmacology**, v. 18, p. 1, 2021.

SABOUNY, R.; FRAUNBERGER, E.; GEOFFRION, M.; NG, A. C. H.; BAIRD, S. D.; SCREATON, R. A.; MILNE, R.; MCBRIDE, H. M.; SHUTT, T. E. The Keap1–Nrf2 stress response pathway promotes mitochondrial hyperfusion through degradation of the mitochondrial fission protein Drp1. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 27, 18, p.447–1459, 2017.

SANTOS, T. M.; SIEBERT, C.; OLIVEIRA, M. F.; MANFREDINI, V.; WYSE, A. T. S. Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2019.

SCHERER, E. B. **Alterações cerebrais, cardíacas e vasculares em ratos adultos submetidos ao modelo químico experimental de hiper-homocisteinemia leve.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SCHWEINBERGER, B. M. **Estresse oxidativo renal em ratos submetidos à hiperhomocisteinemia**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol & Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SHARMA, P.; SENTHILKUMAR, R. D.; BRAHMACHARI, V.; SUNDARAMOORTHY, E.; MAHAJAN, A.; SHARMA, A.; SENGUPTA, S. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. **Lipids Health Dis.**, v. 5, p. 1-19, 2006.

SILVA, V. D. G.; REIS, A. S.; PINZ, M.P.; FONSECA, C. A. R. da; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J.A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundam Clin Pharmacol.**, n. 5, p. 513-525, 2017.

SKOVBY, F.; GAUSTADNES, M.; MUDD, S. H. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. **Mol Genet Metab.**, v. 99, p. 1-7, 2010.

ŠKOVIEROVÁ, H.; VIDOMANOVÁ, E.; MAHMOOD, S.; SOPKOVÁ, J.; DRGOVÁ, A.; ČERVEŇOVÁ, T.; HALAŠOVÁ, E.; LEHOTSKÝ, J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. **Int J Mol Sci.**, v. 17, n. 10, 2016.

SØRENSEN, J. T.; GAUSTADNES, M.; STABLER, S. P.; ALLEN, R. H.; MUDD, S. H.; HVAS, A. M. Molecular and biochemical investigations of patients with intermediate or severe hyperhomocysteinemia. **Mol Genet Metab.**, 117, n. 3, p. 344-50, 2016.

STRECK, E. L.; MATTE, C.; VIEIRA, P. S.; CALCAGNOTTO, T.; WANNMACHER, C. M. D.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. Impairment of Energy Metabolism in Hippocampus of Rats Subjected to Chemically-Induced Hyperhomocysteinemia. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1637, p. 187-192, 2003.

STERN, F.; BERNER, Y. N.; POLYAK, Z.; KOMARNITSKY, M.; SELA, B. A.; HOPP, M.; DROR, Y. Homocysteine effect on protein degradation rates. **Clin Biochem**, v. 37, p. 1002-1009, 2004.

TARAFDAR, A.; PULA, G. The role of NADPH oxidases and oxidative stress in neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, p. 1727-1745, 2017.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANZIN, C. S.; BIANCINI, G. B.; SITTA, A.; WAYHS, C. A. Y.; PEREIRA, I. N.; ROCKENBACH, F.; GARCIA, S. C.; WYSE, A. T. S.; SCHWARTZ, I. V. D.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: A possible role for homocysteine. **Molecular Genetics e Metabolism**, v. 104, p. 112-117, 2011.

VEERANKI, S.; TYAGI, S. C. Defective homocysteine metabolism: Potential implications for skeletal muscle malfunction. **Int J Mol Sci.**, v. 14, p. 15074-15091, 2013.

VESSEY, D. A.; LEE, K. H. Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of culture human keratinocytes with peroxides. **J Invest Dermatol.**, v. 100, p. 829-833, 1993.

VISRAM, M. et al. Homocysteine regulates fatty acid lipid metabolism in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 15, p. 5544-5555, 2018.

VOGT, A. G.; VOSS, G. T.; OLIVEIRA, R. L.; PALTIAN, J. J.; DUARTE, L. F. B.; ALVES, D.; JESSE, C. R.; ROMAN, S. S.; ROEHRS, J. A.; WILHELM, E. A.; LUCHESE, C. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. **Chem Biol Interact.**, v. 282, p. 7-12, 2018.

VOSS, G. T.; GULARTE, M. S.; VOGT, A. G.; GIONGO, J. L.; VAUCHER, R. A.; ECHENIQUE, J. V. Z.; SOARES, M. P.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A.; FAJARDO, A. R. Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising device to accelerate diabetic wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 552, p. 340-351, 2018.

VOSS, G. T.; OLIVEIRA, R. L.; SACRAMENTO, M.; ROEHRS, J.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Contribution of antioxidant action of 7-chloro-4-(phenylselenyl) quinoline to treat streptozotocin-induced diabetic neuropathy in mice. **New Journal of Chemistry**, v. 46, p. 19773-19784, 2022.

ZHANG, J.; ZHENG, Y. G. SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases. **ACS Chem Biol.**, p. 583-597, 2015.

WEIS, S. N.; PETTENUZZO, L. F.; KROLOW, R.; VALENTIM, L. M.; MOTA, C. S.; DALMAZ, C.; WYSE, A. T. S.; ALEXANDRE, C. Mitochondrion Neonatal hypoxia – ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. **Mitochondrion**, v. 12, p. 271-279, 2012.

WEIS, S. N. **Alterações bioquímicas e celulares causadas pela hipóxia-isquemia neonatal:** contribuição do dimorfismo sexual. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

WENDEL, A. Glutationa peroxidase. **Métodos Enzimol.**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WYSE, A. T. S.; BOBERMIN, L. D.; SANTOS, T. M.; QUINCOZES-SANTOS, A. Homocysteine and Gliotoxicity. **Neurotoxicity Research**, n. 3, p. 966-974, 2021.

ANEXOS

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA UFRGS (CEUA/UFRGS)



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 43687

Título: Analisar o efeito protetor do 4-PSQ sobre parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo, Na⁺, K⁺-ATPase e vias de sinalização em modelo experimental de hiper-homocisteinemia severa

Vigência: 09/02/2023 à 07/11/2024

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 09/02/2023
ANDRE QUINCOZES DOS SANTOS - pesquisador desde 09/02/2023

Equipe Externa:

Ethel Wilhelm - pesquisador desde 09/02/2023

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de ratos Wistar de 21 dias de idade (204 machos e 204 fêmeas de aproximadamente 100 g de peso corpora) e 51 progenitoras (idade entre 75 e 90 dias), totalizando 459 animais, provenientes do Biotério de Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 24 de Abril de 2023

Documento assinado digitalmente
 MAITE DE MORAES VIEIRA
Data: 25/04/2023 09:09:58 -0300
Verifique em <https://validar.dl.gov.br>

MAITE DE MORAES VIEIRA
Coordenador da comissão de ética