

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Tese

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONA NO DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO POR DIQUAT NO CÉREBRO DE RATOS WISTAR

Iara Mariana Léllis Ribeiro

Ouro Preto
2022



UFOP

Iara Mariana Lélis Ribeiro

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA
ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONA NO DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO POR
DIQUAT NO CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Katiane Oliveira Pinto Coelho Nogueira

**Ouro Preto, MG
2022**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R484a Ribeiro, Iara Mariana Lellis.

Avaliação in vitro e in vivo da capacidade antioxidante da Isobenzofuran-1(3h)-ona no desequilíbrio redox induzido por Diquat no cérebro de ratos Wistar. [manuscrito] / Iara Mariana Lellis Ribeiro. - 2022. 78 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Katiane Oliveira Pinto Coelho Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Sistema nervoso. 2. Homeostase. 3. Herbicida. I. Nogueira, Katiane Oliveira Pinto Coelho. II. Oliveira, Laser Antônio Machado. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:628

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Iara Mariana Léllis Ribeiro

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da capacidade antioxidante da isobenzofuran-1(3H)-ona no desequilíbrio redox induzido por diquat no cérebro de ratos Wistar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

Aprovada em 16 de agosto de 2022

Membros da banca

Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes - Universidade Federal de Minas Gerais
Dra. Jade de Oliveira - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Dra. Daiane Fátima Engel - Universidade Federal de Ouro Preto

Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 26/09/2022



Documento assinado eletronicamente por **Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/09/2022, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0403193** e o código CRC **73185FD1**.

COLABORADORES

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – Universidade Federal de Ouro Preto – Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Laboratório de Fisiopatologia Experimental - Universidade Federal de Ouro Preto – Dr. Frank Silva Bezerra.

Laboratório de Química – Universidade Federal de Viçosa – Dr. Róbson Ricardo Teixeira.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos amigos espirituais, pelas bênçãos e cuidado.

A minha esposa e melhor companheira de vida, Juliana Freire, pela dedicação, parceria e paciência nesses anos.

A minha família, pelo incentivo e carinho e por sempre torcer e vibrar comigo a cada vitória, especialmente minha mãe Amália e minha avó Maria José, presenças fundamentais na minha vida.

A minha orientadora, Dra. Katiane Nogueira, pela amizade, orientação, incentivo e por todo ensinamento que levarei para sempre comigo.

Ao Dr. Laser Antônio Machado Oliveira pela coorientação do projeto.

Ao Dr. Robson Ricardo Teixeira pela colaboração e disponibilização das isobenzofuran-1 (3H)-onas.

A equipe do LNBio, e a todos os meus colegas pós-graduandos pelo apoio, parceria no desenvolvimento do projeto e pelos momentos de conversa e amizade durante o café de cada dia no laboratório, especialmente, a Ana Luiza, por toda ajuda com os experimentos, sua parceria foi fundamental e indispensável.

A equipe do Lafex pela colaboração e ajuda na realização da bioquímica, em especial aos colegas Thalles de Castro, Ana Beatriz e Pedro Alvez, por me auxiliar sempre que necessário.

Ao Laboratório LFC pela colaboração, em especial ao Lucas Gabriel, pela parceria fundamental no desenvolvimento dos testes comportamentais.

Aos membros do LBTM pela disponibilização dos equipamentos que possibilitaram o desenvolvimento das minhas análises.

Aos funcionários do CCA-UFOP pelo auxílio e o cuidado com os animais.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de doutorado.

Aos funcionários do NUPEB e do BIOTEC, especialmente o secretário Josino Barbosa, pelas orientações e dedicação.

Aos amigos de longa data, Emerson Willian e Stéfanny Cordeiro, pela amizade e apoio emocional sempre que precisei.

A Universidade Federal de Ouro Preto, por possibilitar o desenvolvimento desse projeto, por contribuir com meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista

RESUMO

O sistema nervoso é uma rede complexa de células especializadas que transmitem sinais por diferentes partes do corpo para comunicação e controle de funções como emoções, pensamento, comportamento e memória. O alto consumo de oxigênio, níveis antioxidantes relativamente baixos e pouca capacidade regenerativa fazem com que o tecido cerebral seja especialmente suscetível a danos oxidativos e, conseqüentemente, à neurodegeneração. O diquat (DQ), um herbicida amplamente utilizado na agricultura, é um exemplo de estressor exógeno capaz de sobrecarregar o sistema antioxidante desencadeando danos oxidativos em órgão como o cérebro, fígado e rins. Uma alternativa para a manutenção da homeostase redox diante de agentes estressantes é a utilização de compostos que reparem e substituam biomoléculas oxidadas. Dentro deste contexto, um derivado de isobenzofuran-1(3H)-ona (composto **1**) foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, quanto ao seu poder antioxidante sobre o desequilíbrio redox induzido por DQ. Nos ensaios *in vitro*, realizados em culturas primárias de neurônios hipocâmpais, foram avaliados o metabolismo celular, os níveis intracelulares de EROs e os níveis de peroxidação lipídica. Nos estudos *in vivo* foram realizados, teste bioquímicos, avaliação morfológica do hipocampo e avaliação comportamental de ratos Wistar submetidos ao tratamento com o composto **1** e expostos ao DQ. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que o tratamento com o composto **1** diminuiu os níveis intracelulares de EROs e a peroxidação lipídica dos neurônios expostos DQ. Nos resultados *in vivo*, as análises enzimáticas mostraram uma redução significativa da atividade da superóxido dismutase no grupo exposto ao DQ com ou sem tratamento com o composto **1** e um aumento nos níveis da glutatona reduzida no grupo tratado com o composto **1** e exposto ao DQ, o tratamento com o composto **1** também gerou diminuição nos níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas no cérebro dos animais expostos ao DQ. A análise morfológica do hipocampo dos ratos expostos ao DQ mostrou aumentos no número neurônios lesionados. O tratamento com o composto **1** reduziu os neurônios lesionados nas regiões CA1 e giro denteado. No teste comportamental observou-se que os animais tratados ou não com o composto **1** e expostos ao DQ apresentaram redução da capacidade locomotora no teste de campo aberto e o tratamento com o composto **1** isoladamente mostrou indicativo de ação ansiolítica. Concluímos, que a exposição ao DQ afeta a homeostase redox, causando danos às células e tecidos analisados, no entanto, esses danos podem ser amenizados pelas propriedades antioxidantes do composto **1**.

Palavras-chave: Sistema nervoso, estresse oxidativo, isobenzofuran-1(3H)-ona, diquat, hipocampo.

ABSTRACT

The nervous system is a complex network of specialized cells that transmit signals through different parts of the body for communication and control of functions such as emotions, thinking, behavior and memory. High oxygen consumption, relatively low antioxidant levels and little regenerative capacity make brain tissue especially susceptible to oxidative damage and, consequently, neurodegeneration. Diquat (DQ), an herbicide widely used in agriculture, is an example of an exogenous stressor capable of overloading the antioxidant system, triggering oxidative damage in organs such as the brain, liver and kidneys. An alternative for maintaining redox homeostasis in the face of stressors is the use of compounds that repair and replace oxidized biomolecules. Within this context, an isobenzofuran-1(3H)-one derivative (compound **1**), were evaluated *in vitro* and *in vivo* for its antioxidant power on DQ-induced redox imbalance. *In vitro* tests, performed on primary cultures of hippocampal neurons evaluated, cell metabolism, intracellular levels of ROS and levels of lipid peroxidation. *In vivo* studies were used for biochemical, histopathological and behavioral analysis of Wistar rats treated with compound **1** and exposed to DQ. The results of *in vitro* tests showed that treatment with compound **1** decreased intracellular levels of ROS and lipid peroxidation of neurons exposed to DQ. *In vivo* results, the enzymatic analyzes showed a significant reduction in superoxide dismutase activity in the group exposed to DQ with or without treatment with compound **1** and an increase in the levels of reduced glutathione in the group treated with compound **1** and exposed to DQ. The treatment with compound **1** also decreased levels of lipid peroxidation and carbonyl proteins in the brain of animals exposed to DQ. Histopathological regions of the hippocampus showed that treatment with Compound **1** decreased dark neurons in CA1 and the dentate gyrus. In the behavioral test, it was observed that animals treated or not with compound **1** and exposed to DQ showed reduced motor capacity in the open field test. Moreover, treatment with compound **1** alone showed an anxiolytic action. We conclude that exposure to DQ affects redox homeostasis, causing damage to the cells and tissues analyzed, however, these damages can be mitigated by the antioxidant properties of compound **1**.

Key words: Nervous system, oxidative stress, isobenzofuran-1(3H)-one, diquat, hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia transportadora de elétrons	14
Figura 2. Estrutura química do diquat	16
Figura 3. Ciclo redox do diquat (DQ)	17
Figura 4. Etapas da peroxidação lipídica	19
Figura 5. Localização do hipocampo no cérebro humano.....	22
Figura 6. Atividade da superóxido dismutase ligada ao cobre ($\text{Cu}^{2+/1+}$)	24
Figura 7. Atividade da catalase hémica	25
Figura 8. Atividade da glutationala peroxidase	26
Figura 9. Síntese do composto 1	28
Figura 10. Representação esquemática hipotetizando o mecanismo neuroprotetor do composto 1 frente a toxicidade induzida por DQ no cérebro de ratos adultos	30
Figura 11. Representação da Redução do (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio Bromide em formazan	34
Figura 12. Mecanismo de ação do diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluoroscéina	35
Figura 13. Delineamento experimental	37
Figura 14. Esquema do campo aberto	42
Figura 15. Metabolismo celular	43
Figura 16. Metabolismo celular	44
Figura 17. Níveis intracelulares de EROs	45
Figura 18. Peroxidação lipídica	45
Figura 19. Peroxidação lipídica	46
Figura 20. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	47
Figura 21. Atividade da enzima catalase (CAT)	48
Figura 22. Nível da glutationala reduzida (GSH)	49
Figura 23. Peroxidação lipídica	49
Figura 24. Proteínas carboniladas	50
Figura 25. Reação de compartilhamento de elétrons	52
Figura 26. Reação de adição nucleofílica	52
Figura 27. Neurônios lesionados	54

Figura 28. Imagens das regiões do hipocampo de ratos Wistar	56
Figura 29. Capacidade locomotora	57
Figura 30. Comportamento ansioso	58

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Micro litro

μMol – Micro molar

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto

Abs – Absorbância

TCA – Ácido tricloroacético

ANOVA – Análise de variância

AP-1 – Proteína ativadora-1

ATP – Adenosina trifosfato

BHT – Butil Hidroxi Toluol

CA1- CA4 – Cornu Ammonis subcampo 1-4

CAT – Catalase

CCA – Centro de Ciência Animal

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Cl^\bullet – Radical cloro

CO_2 – Dióxido de carbono

Composto **1–3-(2-Hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxo-cyclohexen-1-yl)isobenzofuran-1(3H)-ona**

Cu – Cobre

Cu/ZnSOD – Superóxido dismutase de cobre e zinco

DA – Doença de Alzheimer

DCF – 2,7-diclorofluoresceína

DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

DP – Doença de Parkinson

DQ – Diquat

DQ^+ – Monocátion diquat

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM – Erro padrão da média

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ϵ – Coeficiente de extinção molar em unidades de $39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

Fe – Ferro
Fe(III)-E – Grupo heme da enzima catalase
FeSOD – Superóxido dismutase de ferro
GD – Giro denteado
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSH – Glutathione reduzida
GSSG – Glutathione oxidada
H• – Átomo de hidrogênio
H₂DCF – 2,7 - diclorodihidrofluoresceína
H₂DCFDA – Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HBA – Hidrogênio aceitador de ligação
HBD – Doador de ligação de hidrogênio
HBSS – Solução Balanceada de Hank's livre de Ca²⁺ e Mg²⁺
HCL – Ácido clorídrico
IL-8 – Interleucina 8
L• – Radical lipídico
LOO• – Radical peroxídico lipídico
LOOH – Hidroperóxido lipídico
MDA – Malondialdeído
Mn – Manganês
MnSOD – Superóxido dismutase de manganês
MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB – Fator nuclear kappa B
nM – Nano molar
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Radical superóxido
OH• – Radical hidroxila

ONOO⁻ – Peroxinitrito
Paraquat – Dicloreto de 1,1-dimetil-4,4-bipiridíio
PBS – Tampão fosfato salino
pH – Potencial hidrogeniônico
PQ – Paraquat
PTP – Poros de transição de permeabilidade
RS^{*} – Radical tiila
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α – Fator de necrose tumoral Alfa
TPSA – Superfície polar total
U – Unidade
VA = volume da amostra (1 mL);
Zn – Zinco

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Espécies reativas de oxigênio e os processos redox	13
1.2 Os processos redox no sistema nervoso	20
1.3 Antioxidantes	23
1.4 3-(2-hidroxi 4-4 dimetil-6-oxociclohex1-enil) isobenzofuranona (composto 1)	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2. Análises <i>in vitro</i>	32
3.2.1 Estabelecimento da cultura primária de neurônios hipocampais	32
3.2.2 Ensaio experimentais	33
3.2.2.1 Metabolismo celular	33
3.2.2.2. Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs)	35
3.2.2.3. Peroxidação lipídica	36
3.3 Análises <i>in vivo</i>	36
3.3.1 Grupos experimentais e tratamento	36
3.3.2 Análises bioquímicas dos danos oxidativos	37
3.3.2.1 Processamento e homogeneizado tecidual	37
3.3.2.2 Proteínas totais	37
3.3.2.3 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	38
3.3.2.4 Atividade da Catalase (CAT)	38
3.3.2.5 Glutathiona reduzida (GSH)	39
3.3.2.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	39
3.3.2.7 Proteína carbonilada	40
3.3.3 Análise morfométrica	41
3.3.4 Teste comportamental	41
3.3.4.1 Campo aberto	41
3.4 Análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Estudo <i>in vitro</i>	43

4.2 Estudo <i>in vivo</i>	46
4.2.1 Bioquímica	46
4.2.2 Morfologia hipocampal	53
4.2.3 Avaliação comportamental	57
5 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO I - Artigos Publicados	74
ANEXO II - Depósito do pedido de patente	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio e os processos redox

Um radical livre é definido como qualquer espécie contendo um ou mais elétrons desemparelhados (LOBO et al., 2010). Uma ampla variedade de radicais livres é produzida em organismos vivos, incluindo o átomo de hidrogênio (H^{\bullet}), os radicais tiila (RS^{\bullet}) e os radicais de cloro (Cl^{\bullet}) (BERG et al., 2004). Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são termos utilizados para descrever um coletivo que inclui, os radicais livres e alguns derivados não radicalares de oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Entre eles, os mais conhecidos são o oxigênio singleto (1O_2), o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (LÜ et al., 2010; XU et al., 2017). Como a utilização do oxigênio é um pré-requisito para a vida de todos os seres aeróbios, as EROs estarão sempre sendo produzidas como consequência do metabolismo desses organismos (SAYRE et al., 2001; BARNHAM et al., 2004).

A produção de EROs ocorre principalmente como efeito colateral da respiração aeróbica na cadeia respiratória, presente na membrana mitocondrial interna (VENDITTI et al., 2013). A cadeia respiratória consiste em uma série de complexos ligados à membrana, como o complexo I (nicotinamida adenina dinucleotídeo ubiquinona óxido-redutase), complexo II (succinato-desidrogenase), complexo III (ubiquinona: citocromo c óxido-redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e a adenosina trifosfato sintase (ATP sintase) (LI et al., 2013). O oxigênio é o acceptor final dos elétrons que passam pelos complexos mitocondriais e sofre uma redução de quatro elétrons, produzindo água (BALDI et al., 2003; FEDERICO et al., 2012). No entanto, durante a passagem pelos complexos da cadeia respiratória, alguns elétrons escapam e se ligam ao oxigênio molecular, gerando uma redução incompleta do oxigênio e formando $O_2^{\bullet-}$ e, mais tarde, H_2O_2 e HO^{\bullet} (MAILLOUX et al., 2013) (Fig. 1).

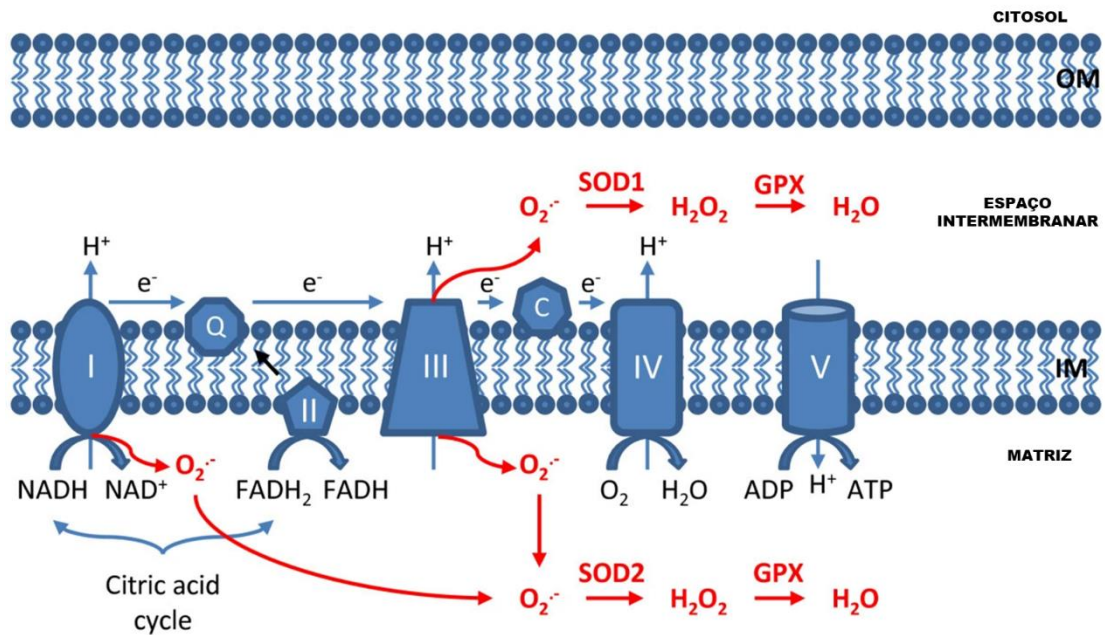


Figura 1. Cadeia transportadora de elétrons. A energia derivada do transporte de elétrons pelos complexos mitocondriais é convertida em uma força próton-motriz para esses complexos realizarem o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Os prótons tendem a retornar a matriz e para isso passam pela enzima ATP-sintase propiciando a formação de ATP. Durante esse processo ocorre a redução incompleta do oxigênio e consequente formação de O_2^- . (LI et al., 2013).

Além da mitocôndria, a NADPH oxidase (NOXs) é outra importante fonte endógena de EROs intracelular (BEDARD e KRAUSE, 2007). As NOXs são enzimas que atravessam a membrana e produzem O_2^- ou H_2O_2 de forma dependente de NADPH em resposta a estímulos fisiológicos específicos, como o estresse (MAGNANI e MATTEVI, 2019). Outras fontes endógenas de EROs são a xantina oxidase e a aldeído oxidase, enzimas localizadas no citoplasma do cérebro e nas membranas nucleares e podem aumentar a produção de H_2O_2 e O_2^- , e a monoamina oxidase, uma oxidase cerebral, contendo o cofator flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), localizada na membrana mitocondrial externa, que catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas, produzindo grandes quantidades de H_2O_2 (BERG et al., 2004).

Os metais de transição também podem atuar como mediadores de processos redox (WELCH, et al., 2002). Eles são essenciais para a síntese de grande número de enzimas, transporte de O_2 e várias reações redox. No entanto, a capacidade de sofrer transferência de um elétron torna os metais de transição potencialmente perigosos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Os íons ferro e cobre, por exemplo, são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres (WELCH, et al., 2002, HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A

participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (BARBOSA et al., 2010). A primeira diz respeito à geração de radical OH^\bullet , por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^- , gerando o radical OH^\bullet (KEHRER, 2000; YAN et al, 2020).

Níveis aumentados de cálcio intracelular também podem contribuir para o desequilíbrio redox em células com baixos níveis de ATP ou como resultado de super estimulação por estímulos excitotóxicos. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) humano, atua nos receptores ionotrópicos N-Metil-D-Aspartato (NMDA) além dos receptores amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (AMPA) e kainato (PLAITAKIS e SHASHIDHARAN, 2000; SHAW e BAINS, 2002). A homeostase do cálcio prejudicada, com altos níveis de cálcio intracelular, pode levar à estimulação descontrolada de várias enzimas dependentes de cálcio e à estimulação da geração de EROs mitocondriais (STARKOV et al., 2004). Por causa de sua grande necessidade de energia, os neurônios são especialmente vulneráveis à excitotoxicidade e ao comprometimento do metabolismo do glutamato (BERG et al, 2004).

Quanto aos fatores exógenos, a exposição à poluição do ar é um exemplo que contribui para o estabelecimento do desequilíbrio redox (SANTOS et al., 2021). A poluição do ar varia muito entre países, regiões e cidades mas, de maneira geral, estima-se que, globalmente, 42% das pessoas já foram expostas a material particulado fino acima das concentrações consideradas como de risco mínimo e 43% delas a ozônio. (GBD, 2017; SANTOS et al., 2021). Os danos provocados, principalmente ao sistema cardiorrespiratório, pelos poluentes particulados e gasosos estão possivelmente associados aos mecanismos envolvidos na inflamação e no desequilíbrio redox induzido por EROs (HERNÁNDEZ et al., 2013; LEE et al., 2017). Se a produção de EROs supera as defesas antioxidantes, ocorre a ativação do complexo MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), envolvido na ativação de fatores de transcrição nuclear, como $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e AP-1, que estimulam a síntese de RNA e a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e $\text{TNF-}\alpha$ (KARUPPAGOUNDER et al., 2012; LEE et al., 2017). Assim a inalação persistente de poluentes do ar gera EROs que desencadeiam e amplificam o processo inflamatório levando a produção endógena de mais EROs (SANTOS et al., 2021).

Outra fonte exógena de radicais livres são os agrotóxicos, mundialmente conhecidos como pesticidas (BJØRLING-POULSEN et al., 2008). A exposição a pesticidas pode induzir desequilíbrio redox por aumento da produção de radicais livres que se acumulam nas

células e por alteração nos mecanismos de defesa antioxidante, incluindo inativação de enzimas de desintoxicação (ABDOLLAHI et al., 2004, HERNÁNDEZ et al., 2013). O desequilíbrio redox desempenha um papel importante na toxicidade de vários pesticidas, incluindo organofosforados (POSSAMAI et al., 2007), organoclorados (PENELL et al., 2014), piretróides (RAINA et al., 2009), triazinas (SINGH et al., 2010), neonicotinóides (PISA et al., 2015), ditiocarbamatos e bipyridílicos (AHMAD et al., 2013).

Os pesticidas podem ser classificados em diversos tipos de acordo com sua finalidade, como inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, rodenticidas, nematicidas e reguladores de crescimento vegetal (LEE et al., 2017). O Diquat (DQ) (1,1'-etileno-2,2'-bipiridílio) é um herbicida amplamente utilizado no mundo (PIZZUTTI et al., 2016) para controle de ervas daninhas e no cultivo de batata, café, feijão, soja e frutas cítricas (SILVA, 2017; MEHMANDOST et al., 2020).

O DQ pertence à classe química dos bipyridílios. Ele possui dois anéis aromáticos de piridina nos quais um átomo de carbono é substituído por um átomo de nitrogênio, acoplados por uma ponte saturada (CH₂)_n sendo neste caso, n = 2 (Fig. 2) (MAGALHÃES et al., 2018).

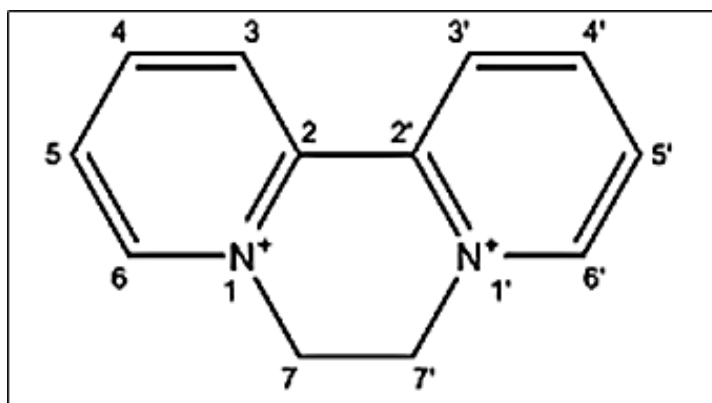


Figura 2. Estrutura química do diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridylium) (Magalhães et al., 2018).

O potencial herbicida do DQ foi descoberto após uma série de investigações sobre germicidas de amônio quaternário (COE et al., 2006). Após sua descoberta, estudos que buscavam sintetizar sais de amônio quaternário de substâncias bipyridílio isoméricas e avaliar sua atividade herbicida mostraram que havia uma relação entre o efeito herbicida do DQ e sua estrutura química específica (HOMER et al., 1960; MAGALHÃES et al., 2018). Além disso, verificou-se que o DQ pode ser facilmente reduzido a um radical livre e esse processo tem um papel fundamental em seus efeitos herbicidas (MAGALHÃES et al., 2018).

Por ser um pró-oxidante potente, o DQ tem sido usado como indutor para estudos relacionados ao desequilíbrio redox (LU et al., 2010; HIGUCHI et al., 2011). A capacidade

do DQ de induzir o desequilíbrio redox foi sugerida como estando associada com suas propriedades de ciclagem redox (FRANCO et al., 2010). O DQ é reduzido ao receber um único elétron do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH), a principal fonte de equivalentes redutores nas células, em uma reação independente do pH, catalisada pela citocromo-P450 redutase, formando NADP⁺ e o radical DQ[•] altamente instável, que, por sua vez, transfere um elétron para o oxigênio molecular gerando o radical O₂^{•-} (Fig. 3). O DQ retorna então à sua forma original e pode, mesmo em pequenas quantidades, passar por esse processo contínuo para gerar grandes quantidades de O₂^{•-}. (HIGUCHI et al., 2011; HIGUCHI et al., 2011b).

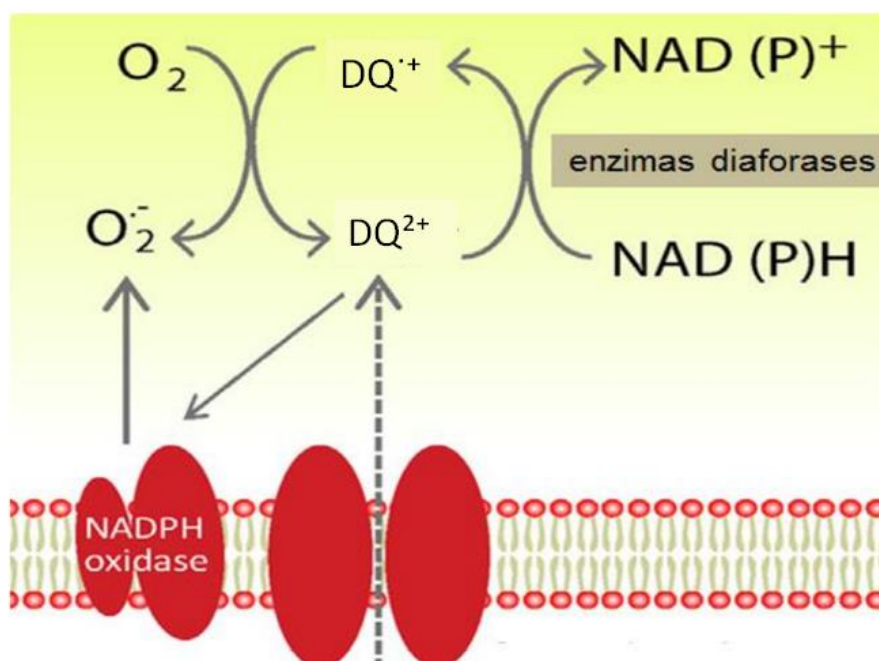


Figura 3. Ciclo redox do diquat (DQ). O DQ²⁺ reage com enzimas diaforases, atuando como agente redutor, transformando-se em sua forma monocatiónica. Na presença de O₂, oxida-se rapidamente à sua forma original, produzindo O₂^{•-}. (Adaptado de Baltazar et al., 2014).

Acredita-se que o DQ também pode induzir a formação de EROs pela inibição dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (DRECHSEL e PATEL, 2009; FRANCO et al., 2010) e a partir das células da glia (Bayol-Denizot et al., 2000; FRANCO et al., 2010). Existem inúmeros estudos mostrando os efeitos do DQ na substância negra (BONNEH-BARKAY et al., 2005; CANNON e GREENAMYRE, 2010; CANTU et al., 2011; SINGH et al., 2013) e raros estudos mostrando a ação do DQ em outras regiões do cérebro como córtex e hipocampo (DJUKIC et al., 2012; HITTI e SIEGELBAUM, 2014). Além dessa capacidade neurotóxica, o DQ também apresenta toxicidade sistêmica mediada

por radicais livres e seu envenenamento é direcionado à sua nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (LU et al., 2010; HIGUCHI et al., 2011b).

Apesar de produzidas por diversos meios intracelulares, as EROs têm seus níveis, no organismo, controlados (ZOROV et al., 2014). Em condições de homeostase as EROs são geradas como resultado do metabolismo e não alteram as funções fisiológicas do organismo (LIOU e STORZ, 2010). Em níveis adequados as EROS atuam como intermediários e auxiliam na proliferação, migração e diferenciação celular, no controle da homeostase de células e tecidos e ativando a via de sobrevivência mediante resposta ao estresse (FARRUGIA e BALZAN, 2012; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Um exemplo da atuação das EROs como mensageiros intermediários ocorre no processo de cicatrização. Segundo Balbino et al. (2005), danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam, de imediato, uma série de eventos no microambiente levando a alterações na sua composição físico-química. Uma dessas alterações, além da baixa tensão de O₂, e diminuição do pH, é a presença de EROs. Assim, essas alterações atuam como uma forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular. Entretanto, a interrupção no equilíbrio pró e antioxidante do organismo gera EROs em excesso desencadeando danos oxidativos (NIU et al., 2011).

Em concentrações elevadas, as espécies reativas induzem diversas ações no metabolismo como danos aos componentes mitocondriais que levam à abertura de poros de transição de permeabilidade (PTP) na membrana mitocondrial (ZOROV et al., 2014). A abertura do PTP causa despolarização, edema e ruptura da membrana externa da mitocôndria. Esses danos acarretam disfunção da organela comprometendo a viabilidade da célula (CHEN et al., 2015; HAN et al., 2015; SÁNCHEZ et al., 2019).

As membranas celulares são alvos importantes das EROs (AYALA et al., 2014b). Os radicais livres podem extrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados, causando peroxidação lipídica (REED, 2011; NIEDZIELSKA et al., 2016). A peroxidação lipídica envolve uma cascata de reações, descritas em uma sequência de três etapas, que causam a degradação dos lipídios (SULTANA et al., 2013). A primeira etapa é a iniciação, os pró-oxidantes, abstraem o hidrogênio centrado no carbono na cadeia acila dos fosfolipídios e formam o radical lipídico (L·). Na segunda etapa, denominada de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar um radical peróxido lipídico (LOO·). Esse radical abstrai outro hidrogênio alílico de outra molécula lipídica gerando um novo radical lipídico e hidroperóxido lipídico (LOOH) em uma reação em cadeia autoperpetuada que leva a uma variedade de peróxidos e hidroperóxidos cíclicos (SULTANA et al., 2013; AYALA

et al., 2014b; SÁNCHEZ et al., 2019). A terminação ocorre na terceira etapa, na qual diferentes tipos de radicais reagem mutuamente levando à formação de produtos estáveis, ou em reações entre os radicais e os antioxidantes dando origem a produtos não radicais ou radicais não reativos (Fig. 4) (SULTANA et al., 2013).

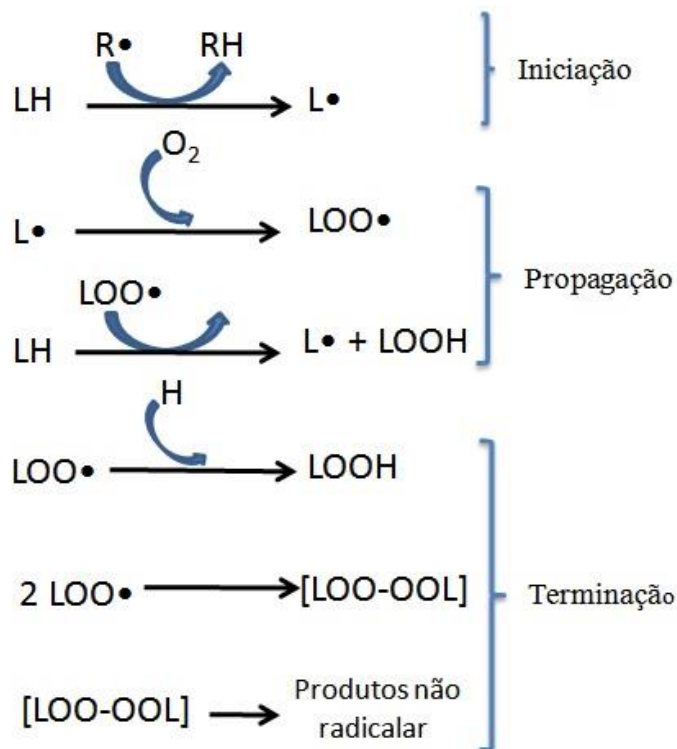


Figura 4. Etapas da peroxidação lipídica. Radical lipídico ($L\cdot$); peroxídico lipídico ($LOO\cdot$); hidroperóxido lipídico ($LOOH$). Na etapa de iniciação, os pró-oxidantes, abstraem o hidrogênio dos fosfolipídios e forma o radical lipídico ($L\cdot$); na etapa de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar um radical peroxídico lipídico ($LOO\cdot$) e esse radical abstrai outro hidrogênio alílico de outra molécula lipídica gerando um novo radical lipídico e hidroperóxido lipídico ($LOOH$); na etapa de terminação, os radicais reagem mutuamente levando à formação de produtos estáveis (fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Representa%C3%A7%C3%A3o_das_etapas_da_peroxida%C3%A7%C3%A3o_lip%C3%ADica.jpg).

Os produtos de conversão da peroxidação lipídica levam à decomposição de ácidos graxos poli-insaturados e à formação dos aldeídos reativos, como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal (REED, 2011). Esses compostos reagem com moléculas de DNA ou proteína e modificam sua estrutura e função (ALBARRACIN et al., 2012; FRITZ e PETERSEN, 2013). Quanto ao DNA, o desequilíbrio redox pode gerar várias formas de danos mutacionais, como por exemplo modificação de bases nitrogenadas. Essas mutações comprometem a integridade e a funcionalidade do DNA gerando patologias como o câncer, além de estarem associadas com o envelhecimento (FEDERICO et al., 2012; KULBACKA et al., 2012). A peroxidação lipídica generalizada compromete a função da membrana celular podendo desencadear a apoptose (GAWARAMMANA e BUCKLEY, 2010).

Outra consequência do desequilíbrio redox é a reação do oxigênio com óxido nítrico dando origem ao peroxinitrito, que reage rapidamente com outras moléculas (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). O peroxinitrito é um oxidante prejudicial que pode causar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, nitração de proteínas e inativação de enzimas (BALDI et al., 2003; IGHODARO e AKINLOYE, 2018).

1.2 Os processos redox no sistema nervoso

O sistema nervoso é uma rede complexa de células especializadas que transmitem sinais por diferentes partes do corpo. Estruturalmente, é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo, constituintes neurais do sistema fotorreceptor e medula espinal, o SNP consiste em nervos e gânglios nervosos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; MACHADO, 2014; NEVID, 2016; ZIMMERMANN, 2018). O parênquima do sistema nervoso são os neurônios, que em seres humanos, podem alcançar um total de 100 bilhões. Associadas às células neuronais, atuando como matriz extracelular estão as células da glia ou neurógliã, que compreende astrócitos, oligodendrócitos, microglíócitos e um tipo de glia com disposição epitelial, denominadas células endimárias. Juntas as células da glia oferecem aos neurônios suporte como mielinização, sustentação, modulação da atividade neuronal e defesa (HOUZEL, 2009; MACHADO, 2014; PURVES et al., 2017).

No cérebro há intrincadas redes de neurônios e glia, que permitem a comunicação e o controle de funções como emoções, pensamento, comportamento, memória e outras atividades (SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2018). O comprometimento dessas redes pode desencadear a neurodegeneração (CHEN et al., 2015), levando ao desenvolvimento de patologias como esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA) (IBRAHIM et al., 2018; SARDOIWALA et al., 2018). Essas doenças neurodegenerativas afetaram coletivamente 4,7 a 6,0 milhões de indivíduos nos estados unidos entre 2016-2017 sendo responsáveis por 272.644 mortes (DORSEY et al. 2018; MATTHEWS et al. 2019; YANG et al. 2020).

A patogênese de muitas dessas doenças neurodegenerativas está frequentemente associada ao desequilíbrio redox (NIKOLOVA, 2012; SARDOIWALA et al., 2018). Na literatura é relatado defeitos nas atividades de transferência de elétrons mitocondriais em distúrbios como as doenças de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) (BROUILLET et al., 2005; HANAGASI et al., 2005; FRANCO et al., 2010; SINGH et al., 2012; AYALA et al., 2014).

A DP, se caracteriza pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra e, como consequência, culmina em um grupo de sintomas motores, como rigidez, tremor, bradicinesia e desequilíbrio postural (MCCOLLUM et al., 2010; SEET et al., 2010; WANG et al., 2014; IBRAHIM et al., 2018). Muitos estudos forneceram evidências de que o desequilíbrio redox contribui para todas as formas de DP, embora ainda não esteja estabelecido se o desequilíbrio redox é um evento desencadeante ou uma consequência de outros fatores patogênicos (JENNER 1993; KRISHNAN et al. 2003; BERG et al., 2004; PERCÁRIO et al., 2020). No entanto, a superprodução de EROs e de ERNs são indiscutivelmente importantes mediadores da morte celular nesta doença (SINGH et al., 2019). A DA é uma patologia caracterizada pelo depósito extracelular de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares intracelulares que levam ao aumento do desequilíbrio redox e à neuroinflamação levando a morte neuronal (BALDI et al., 2003; NIKOLOVA, 2012; SARDOIWALA et al., 2018). Esses eventos estão intimamente relacionados com a região do hipocampo (LI et al., 2016).

Estrutura pareada, o hipocampo se encontra encaixada profundamente no lobo temporal do córtex cerebral (Fig. 5) (DUVERNOY et al., 2013; AJAYI, 2020). Em conjunto com outras estruturas do lobo temporal medial, forma o sistema límbico, presente em todos os mamíferos, cujos componentes se encontram envolvendo o topo do tronco encefálico e possui funções fundamentais nos processos cognitivos (BARRETO e SILVA, 2010; EICHENBAUM, 2014; KANDEL et al., 2014). A rede de conexões, constituída por essas estruturas, estabelece circuitos essenciais responsáveis pela memória, emoções, aprendizagem, raciocínio, coordenação das atividades sociais, mediação da agressão e raiva, funções motoras, sensitivas, e regulação hormonal (BARRETO e SILVA 2010; CATANI et al., 2013; KANDEL et al., 2014).

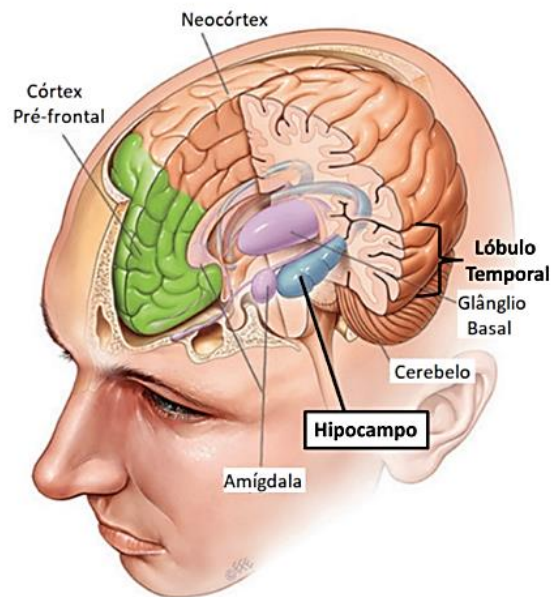


Figura 5: Localização do hipocampo no cérebro humano. O hipocampo está profundamente inserido em cada lóbulo temporal medial do cérebro (fonte: <https://italo.com.br/blog/italo/memoria/>).

Especificamente, o papel mais bem reconhecido do hipocampo é a mediação da memória episódica declarativa, sendo responsável pelo acúmulo e consolidação de informações na aprendizagem, e estabelecimento de memórias de longo prazo (EICHENBAUM, 2014; JIN e MAREN, 2015; BEAR et al., 2020).

Além da DP e da DA, um crescente corpo de evidências especulou ainda sobre o envolvimento de processos redox na iniciação e progressão da esclerose múltipla, doença inflamatória e imunomediada do sistema nervoso central (SINHA et al., 2013; K. OHL et al., 2016; PEGORETTI et al., 2020).

Essas patologias mostram a alta susceptibilidade do tecido cerebral aos danos oxidativos que resultam na neurodegeneração. Isso está associado ao fato de o sistema nervoso ser particularmente vulnerável à oxidação porque o cérebro é rico em ácidos graxos poli-insaturados, além de ser um tecido com baixos níveis de defesas antioxidantes enzimáticas (UTTARA et al., 2009). Por isso, uma variedade de estratégias terapêuticas, voltadas para as disfunções neurodegenerativas, têm tido como alvo o desequilíbrio redox (SI et al., 2013; TURKEZ et al., 2015; ASADBEGI et al., 2017).⁷

1.3 Antioxidantes

Para conter o dano oxidativo, sistemas que reparem e substituam moléculas oxidadas são essenciais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Esses sistemas são formados por compostos e/ou enzimas com capacidade antioxidante (PRUCHNIAK et al., 2016). Antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo, não existindo um antioxidante universal, e sim diferentes antioxidantes que reagem com diferentes espécies reativas em taxas variáveis e, atuam em vários locais protegendo diferentes alvos moleculares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Essas substâncias, que atuam na defesa contra os danos oxidativos, podem ser divididas em antioxidantes endógenos e exógenos (KURUTAS, 2016). As defesas endógenas são constituídas por pequenas moléculas com atividade antioxidante e por um sistema de enzimas composto principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (BIRBEN et al., 2012; IGHODARO e AKINLOYE, 2018). Essas enzimas antioxidantes estão localizadas em áreas subcelulares específicas, com distribuição variada em cada órgão e diferentes necessidades de metais específicos em seus sítios catalíticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A SOD é a primeira enzima de desintoxicação e o antioxidante mais poderoso da célula (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). Existem pelo menos três tipos de SOD. A SOD manganês (MnSOD) é comum em bactérias, plantas e animais. Na maioria dos tecidos e leveduras animais, MnSOD está amplamente (e geralmente inteiramente) localizado na mitocôndria, a SOD contendo ferro (FeSOD), encontrada em muitas bactérias, algas, tripanossomas, leveduras e plantas superiores, mas não em animais, e a SOD contendo os metais cobre e zinco (Cu/ZnSOD). O mais prevalente nos eucariotos é Cu/ZnSOD, que é encontrado principalmente no citosol (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A descoberta da SOD forneceu grande parte da base para nossa compreensão atual da defesa antioxidante, uma vez que levou à postulação da teoria dos ânions superóxidos, da toxicidade do oxigênio e à compreensão de que os radicais de oxigênio são produtos biológicos importantes (MÜLLER et al., 2012). A atividade antioxidante das SOD ocorre ao catalisar a dismutação de duas moléculas do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (Fig. 6) (KRISHNAMURTHY e WADHWANI, 2012; IGHODARO e AKINLOYE, 2018).

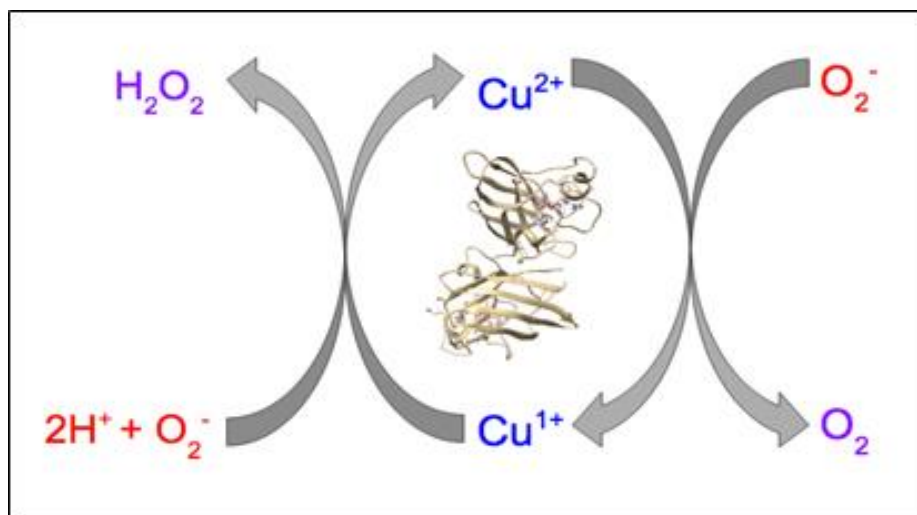


Figura 6. Atividade da superóxido dismutase ligada ao cobre ($\text{Cu}^{2+/1+}$). A enzima superóxido dismutase catalisa a conversão de duas moléculas de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (fonte: [https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3ABioinorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_\(Saint_Mary%27s_College\)/Antioxidant%3A_Cu%2F%2FZn_Superoxide_dismutase_\(SOD1\)](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3ABioinorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_(Saint_Mary%27s_College)/Antioxidant%3A_Cu%2F%2FZn_Superoxide_dismutase_(SOD1))).

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante presente em quase todos os tecidos vivos aeróbios e, embora sua atividade varie entre os tipos de células, tecidos e órgão, há uma predominância desta enzima nos animais, no fígado (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). Outros órgãos como o cérebro, o coração e o músculo esquelético apresentam níveis mais baixos de catalase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A CAT de animais contém quatro subunidades, cada uma das quais com Fe(III)-heme em seu sítio ativo (ZÁRATE-ROMERO et al., 2019). A estrutura do grupo heme torna o sítio ativo da molécula acessível apenas por um canal revestido com resíduos hidrofóbicos, evitando que a maioria das moléculas, exceto H_2O_2 , tenha acesso. Cada subunidade geralmente possui uma molécula de NADPH ligada a ela (GOYAL e BASAK, 2012).

A CAT utiliza o ferro ou manganês como um cofator e catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e O_2 , completando o processo de desintoxicação iniciado pela SOD (CHELIKANI et al., 2004). É abundante nas células e altamente eficiente, estando localizada principalmente nos peroxissomos (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). A atividade da CAT hémica, ocorre em duas etapas; uma molécula de H_2O_2 oxida o grupo heme da enzima para uma espécie de oxiferril e água. Em seguida, uma segunda molécula de H_2O_2 atua como um agente redutor para regenerar a enzima e produzir uma molécula de O_2 e água (Fig. 7) (CHELIKANI et al., 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005).

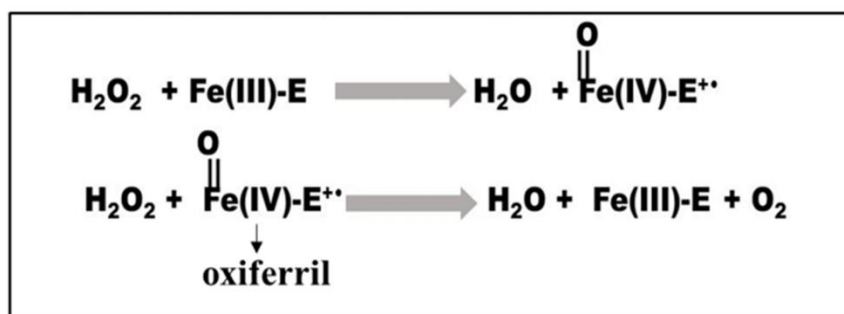


Figura 7. Atividade da catalase hémica. A enzima catalase catalisa a conversão de duas moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas de água (H_2O) e uma molécula de oxigênio (O_2). Grupo heme da enzima catalase (Fe(III)-E) (fonte: <https://www.slideserve.com/elaysia/a-b-c-d>).

Outra enzima importante na remoção de H_2O_2 é a glutatona peroxidase (GPx) (BAEK et al., 2007). Existem pelo menos oito isoformas da GPx em humanos (GPx1 – GPx8) (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). A primeira delas foi descoberta em tecidos animais em 1957. Elas são menos comuns em plantas ou bactérias e são amplamente distribuídas em tecidos animais (MORÓN e CORTÁZAR, 2012). Entre as glutatonas peroxidases, a GPx1, contém selênio no seu sítio ativo para exercer sua atividade antioxidante e é a mais abundante, estando presente em todas as células (DREVET, 2006; IGHODARO e AKINLOYE, 2018). A remoção de H_2O_2 pela GPx ocorre acoplada a glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo que atua como doador de elétrons para o H_2O_2 com sua consequente oxidação. O produto gerado, a glutatona oxidada (GSSG), consiste em duas GSHs ligadas por uma ponte dissulfeto, e pode ser regenerada a GSH pela ação da enzima glutatona redutase (GR) (Fig. 8) (FLOHÉ, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Uma vez que a quantidade de CAT é baixa na maioria das regiões do cérebro, as enzimas GPx e as peroxiredoxinas assumem um papel importantes na remoção de H_2O_2 nesse órgão (FLOHÉ, 1999; FORMAN et al., 2014).

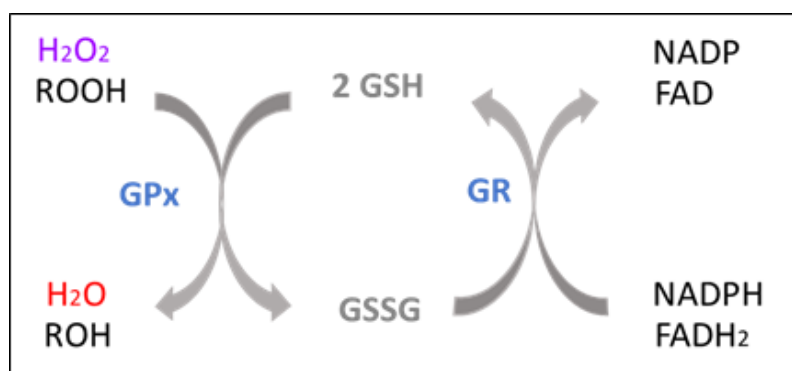


Figura 8. Atividade da glutatona peroxidase. A glutatona peroxidase (GPx), acoplada à glutatona reduzida (GSH), catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O). Glutatona oxidada (GSSG); hidroperóxido (ROOH); produto de redução correspondente (ROH) (modificada de Genc et al., 2017).

Além das defesas antioxidantes endógenas, existem os antioxidantes exógenos, que atuam auxiliando as enzimas antioxidantes e contribuem para minimizar os danos causados pelo desequilíbrio redox (RAO et al., 2011; IBRAHIM et al., 2018). Esses antioxidantes exógenos são moléculas que podem impedir ou retardar o processo de oxidação inibindo as reações em cadeia oxidativa, atuando como sequestradores de radicais livres e/ou agentes redutores (IBRAHIM et al., 2018). Tais antioxidantes podem reagir diretamente com os radicais livres e tornarem-se novos radicais livres menos ativos, de vida mais longa e menos perigosos. Assim, podem ser neutralizados por outros antioxidantes ou por outros mecanismos para terminar seu status radical (LÜ et al., 2010). Outra ação importante dos antioxidantes exógenos é a regulação das enzimas relacionadas às EROs, esses antioxidantes podem atuar inibindo as atividades ou expressões de enzimas geradoras de radicais livres, como NADPH oxidase e xantina oxidase, ou melhorando as atividades e expressões de enzimas antioxidantes (PANCHATCHARAM et al., 2006; SHIH et al., 2007; LÜ et al., 2010).

Os antioxidantes exógenos normalmente são consumidos na dieta e incluem frutas, legumes, cereais, cogumelos e ervas (XU et al., 2017). Eles podem ser classificados como antioxidantes primários, secundários ou multifuncionais quando exibem ambas as propriedades (SHAHIDI, 2015). Os antioxidantes primários, ou de quebra de cadeia, são capazes de reagir diretamente com os radicais livres, transformando-os em produtos mais estáveis. Portanto, desempenham um papel importante na oxidação lipídica, porque podem reagir com os radicais lipídicos formados e convertê-los em não-radicais, impedindo assim a decomposição adicional dos lipídios (HERMUND, 2018). Já os antioxidantes secundários, também denominados preventivos, trabalham indiretamente na limitação da oxidação lipídica. Vários mecanismos, incluindo a quelatação de metais e a eliminação de oxigênio podem ser exibidos por esses antioxidantes (STANNER e WEICHSELBAUM, 2013; HERMUND, 2018). Além disso, alguns antioxidantes secundários, como o ácido ascórbico, podem atuar regenerando antioxidantes primários garantindo sua atividade antioxidante contínua (STANNER e WEICHSELBAUM, 2013; SHAHIDI, 2015).

Quanto às membranas dos neurônios, os antioxidantes, podem atuar em diferentes níveis na sequência oxidativa envolvendo as moléculas de lipídios (SHAHIDI e NACZK, 2003). Eles podem diminuir a concentração de oxigênio, interceptar o oxigênio singlete, prevenir a iniciação da primeira cadeia pela eliminação de radicais iniciais, como radicais hidroxila, ligar catalisadores de íons metálicos, decompor produtos primários de oxidação

em espécies não radicais e quebrar a reação da cadeia para prevenir abstração contínua de substratos de hidrogênio (SHAHIDI, 2015).

Dessa forma, os compostos com atividade antioxidante podem ser utilizados como uma alternativa terapêutica para as patologias associadas a processos oxidativos, seja através da eliminação ou redução dos níveis de EROs, ou através da ativação de respostas celulares, como ativação de fatores reguladores da transcrição de elementos de resposta antioxidante, levando a um aumento na concentração de enzimas antioxidantes (KASPAR et al., 2009; AYALA et al., 2014).

1.4 3-(2-hidroxi 4-4 dimetil-6-oxociclohex1-enil) isobenzofuranona (composto 1)

Os compostos fenólicos constituem um amplo grupo de substâncias com diversas estruturas químicas diferentes (VALVERDE et al., 2000). Esse grupo de compostos são antioxidantes primários com capacidade de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres (HERMUND, 2018; SÁNCHEZ et al., 2019). Por isso, eles têm sido amplamente estudados e demonstrado grande potencial em atividades biológicas, que podem ser benéficas para a saúde humana (SHETTY e WAHLQVIST, 2004; YAO et al., 2004; OAK et al., 2005). Uma característica desses compostos que os tornam ainda mais atrativos para a terapêutica de doenças neurodegenerativas associadas às EROs é que, dependendo da sua estrutura, eles possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e atuarem inibindo danos oxidativos no sistema nervoso (PARAN et al., 2009; SÁNCHEZ et al., 2019; SERRA et al., 2020).

As isobenzofuran-1(3*H*)-onas, também chamadas de ftalidas, são uma classe de compostos fenólicos de ocorrência natural e sintética (SHYAMLAL et al., 2020). São conhecidas principalmente como constituintes bioativos em várias plantas utilizadas na medicina tradicional na Ásia, Europa e América do Norte e podem ser isoladas também de várias espécies de fungos (LEÓN et al., 2017). Possuem em sua estrutura a presença de um anel benzênico fundido a um anel γ -lactônico e possuem propriedades biológicas significativas, como atividade antialérgica (KURUME et al., 2008), anti-inflamatória (ÁNGEL et al., 2015), antiplaquetária (MA et al., 2012), anticancerígena (KARNA et al., 2010; MISHRA et al., 2014) e antioxidante (MELO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2020).

Considerando o potencial terapêutico dos derivados de isobenzofuranonas foi realizado um estudo *in silico* por Teixeira e colaboradores (2013) para prever suas propriedades farmacocinéticas e a síntese dos derivados 10-22. O composto **1** (composto 20 no estudo de Teixeira et al. (2013)) foi funcionalizado na posição C-3 do anel da

isobenzofuranona (Fig. 9). A condensação promovida por DBU de ácido ftalaldeídico proporcionou o derivado 3-(2-hidroxi 4,4 dimetil-6-oxociclohex1-enil) isobenzofuranona, denominado neste estudo de Composto **1**. O composto foi caracterizado e a espectrometria de massa de alta resolução confirmou a sua fórmula molecular.

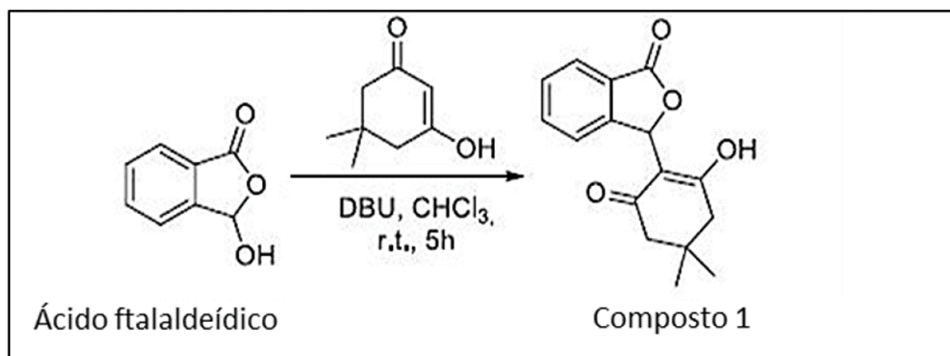


Figura 9. Síntese do composto **1**. Reação de condensação por DBU, entre o ácido ftalaldeídico e a dicetona apropriada produziu o composto **1** (TEIXEIRA et al., 2013).

O estudo realizado por Teixeira et al. (2013) mostrou que o composto **1** apresenta características que o torna um promissor candidato a fármaco. Eles avaliaram o valor de cLogP, parâmetro para determinar a boa absorção de compostos, tendo como base para uma probabilidade razoável de boa absorção o valor inferior a 5,0. Nesse parâmetro o composto **1** apresentou cLogP de 2.3. Segundo Tambunan et al. (2011) normalmente, as drogas que interagem com enzimas dentro do corpo humano têm valores de cLogP entre 2 e 5.

Além do LogP, a área de superfície polar total (TPSA) é um descritor importante para a predição de propriedades de transporte de drogas, incluindo absorção intestinal e na penetração de barreiras (CLARK, 1999; ERTL et al., 2000). Este parâmetro foi calculado por Teixeira et al. (2013) usando o software Molinspiration com base no teor da superfície pertencente a átomos polares (geralmente oxigênios, nitrogênios e hidrogênios anexados).

Os compostos com $TPSA \geq 140 \text{ \AA}^2$ são considerados compostos com baixa biodisponibilidade oral (TEIXEIRA et al., 2013). O composto **1** apresenta $TPSA = 63,604$, tendo boa biodisponibilidade com base no intervalo apresentando. O número de ligações rotativas é outro parâmetro topológico simples de flexibilidade molecular que demonstrou ser um excelente descritor da biodisponibilidade oral de medicamentos (TEIXEIRA et al., 2013). Nesse critério, o composto **1** exibiu $nRotB = 1$, sendo o ideal um $nRotB < 10$ para uma boa biodisponibilidade.

Outra avaliação necessária a um candidato a fármaco é o risco de toxicidade que a estrutura desse composto pode apresentar. Na análise *in silico* para os riscos biológicos

realizada por Teixeira et al., (2013) para o composto **1**, usando o software Osiris, a estrutura analisada não era mutagênica, não tumorigênica, não irritante e sem efeitos na reprodução de mamíferos. Além disso, este composto foi avaliado como fármaco potencial através dos cálculos de semelhança de fármaco, mostrando valores negativos (entre -8,59 e -3,58), indicando que o composto **1** não contém fragmentos que estão frequentemente presentes em drogas comerciais (LIPINSKI, 2004; PROUDFOOT, 2012).

A solubilidade aquosa de um composto afeta significativamente suas características de absorção e distribuição. Em geral, é desejável obter compostos que sejam solúveis em um ambiente biológico. Um parâmetro para avaliar a solubilidade é LogS. De acordo com 19, mais de 80% das drogas no mercado têm valores de LogS estimados acima de -4. No caso do composto **1**, o valor de LogS foi -3,05. A capacidade de ligação de hidrogênio (HBA) foi estimada considerando o número de átomos de nitrogênio e oxigênio na estrutura química. O número de átomos doadores de hidrogênio (HBD) foi a soma dos átomos de hidrogênio ligados ao oxigênio e aos átomos de nitrogênio (LIPINSKI, 2004; TEIXEIRA et al., 2013). Os valores desses parâmetros para o composto **1** (HBA=4 e HBD=1) estão dentro dos limites estabelecidos pelas regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001). De acordo com Teixeira et al., 2013, esta regra também sugere que duas ou mais violações em um composto mostram probabilidade de problemas de biodisponibilidade, e o composto **1** não apresentou violações a essas regras.

Frente a todas as características apresentadas pelo composto **1** decidimos investigar o seu potencial biotecnológico. Para isso, foram criadas colaborações interdisciplinares entre o Laboratório de Química da Universidade Federal de Viçosa, responsável pela síntese do composto **1**, e os Laboratórios de Fisiologia Cardiovascular, Laboratório de Fisiopatologia Experimental e o Laboratório de Neurobiologia e Biomaterias da Universidade Federal de Ouro Preto. Nossa hipótese é que o composto **1**, atuaria como um antioxidante, reduzindo o desequilíbrio redox e consequentemente a neurotoxicidade causada pelo DQ. Assim o composto **1** seria um candidato promissor para o desenvolvimento de um produto com capacidade antioxidante para atuar em processos oxidativos no sistema nervoso central (Fig 10).

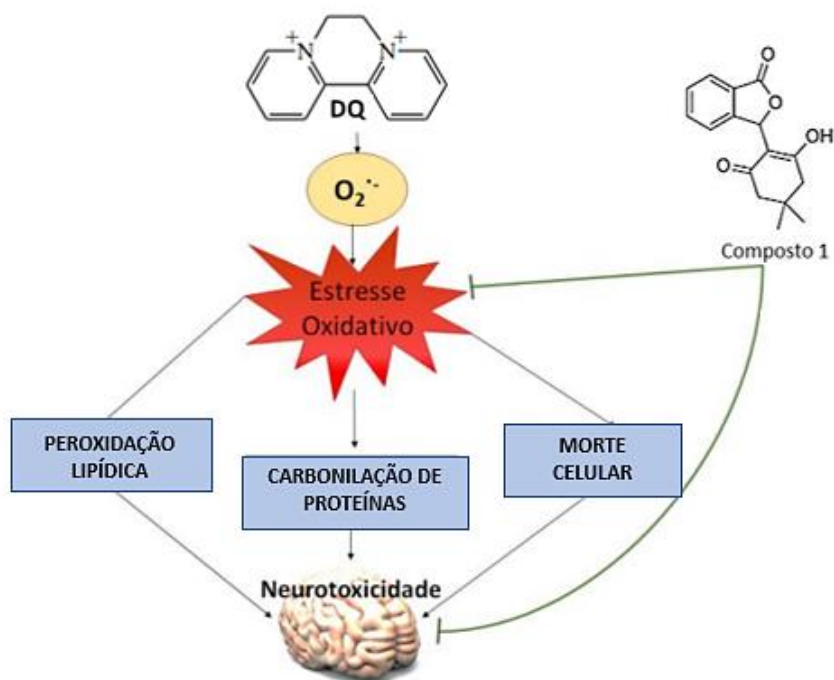


Figura 10. Mecanismo neuroprotetor do composto **1** frente a toxicidade induzida por DQ no cérebro de ratos adultos. O DQ ao entrar na célula participa de reações de oxirredução desencadeando o desequilíbrio redox intracelular. Com isso pode gerar peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e morte celular. O composto **1** ao atuar como antioxidante, impede o desenvolvimento do desequilíbrio redox e consequentemente a neurotoxicidade (modificado de NASPOLINI, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial antioxidante da 3-(2-hidroxi 4-4 dimetil-6-oxociclohex1-enil) isobenzofuranona (composto **1**) no desequilíbrio redox induzido pelo diquat no cérebro de ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em culturas primárias de neurônios hipocampais (*in vitro*) tratadas com composto **1** e expostas ao diquat:

- O metabolismo celular;
- Os níveis intracelulares de EROs;
- A peroxidação lipídica.

Avaliar no hipocampo e córtex de ratos Wistar (*in vivo*) tratados com o composto **1** e expostos ao DQ:

- Atividade enzimática da superóxido dismutase e catalase;
- Níveis da glutathiona reduzida;
- Peroxidação lipídica e proteínas carboniladas;

Realizar a análise histopatológica do hipocampo de ratos Wistar tratados com o composto **1** e expostos ao DQ:

Realizar testes comportamentais em ratos Wistar tratados com o composto **1** e expostos ao diquat para avaliar:

- Capacidade locomotora;
- Perfil tipo ansioso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos de linhagem Wistar com três meses de idade, massa corporal de aproximadamente 180 gramas obtidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram alocados no Biotério (CCA - UFOP) até estarem com peso adequado para realização dos procedimentos experimentais e após, foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Os ratos foram acondicionados em caixas de polipropileno (41x34x21) forradas com maravalha, com quatro animais por caixa, mantidos em ambiente com condições de temperatura, luz, umidade controladas, e receberam dieta (ad libitum), ração comercial Nuvilab® e livre acesso à água. A espécie *Rattus Norvegicus* de linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório e a mais indicada para realização de testes comportamentais. São animais habilitados a processos de aprendizagem, comumente dóceis e de fácil manipulação. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Trabalhos com Animais de Experimentação (CEUA) da UFOP (Protocolo nº 6301140519, que consta no anexo I deste trabalho).

3.2. Análises *in vitro*

3.2.1 Estabelecimento da cultura primária de neurônios hipocampais

Para os cruzamentos, foram colocadas 2 fêmeas para cada macho, permanecendo juntos até a visualização do plug vaginal nas fêmeas. Uma vez constatada a prenhez, as fêmeas foram separadas e identificadas.

As fêmeas grávidas foram eutanasiadas por decapitação após anestesia inalatória de isoflurano. Os embriões foram removidos e transferidos para solução salina de Hank's livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (HBSS, Gibco, Life Technologies,) gelada. Os cérebros dos embriões foram cuidadosamente removidos e com auxílio do microscópio estereoscópio, foi realizada a dissecação dos hipocampos. Os mesmos, foram transferidos para microtubos contendo HBSS gelado e levados para a câmara de fluxo laminar. Para cada placa de 96 poços foram utilizados cerca de 4 embriões de ratos Wistar com 18 dias de desenvolvimento (E18).

O isolamento dos neurônios hipocampais foi realizado utilizando o método de digestão proteolítica com tripsina (Sigma-Aldrich). Os neurônios foram mantidos por 20 min

em tripsina a 37°C. Após esse período a tripsina foi neutralizada por meio de plaquear (Meio mínimo essencial, soro fetal bovino, piruvato de sódio, glicose, penicilina e estreptomicina) por 1 minuto. O meio foi então substituído por meio de plaquear contendo DNase a 1%. Em seguida, os hipocampos foram dissociados mecanicamente, os neurônios contados em câmara de Neubauer e plaqueados a uma densidade de 1×10^5 células por poço, em placas de cultura com 96 poços previamente cobertos com poli-L-lisina. Os neurônios foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 4 horas para aderência. Após esse tempo, o meio de plaquear foi substituído por meio de manutenção (Neurobasal, B-27, L-glutamina, penicilina e estreptomicina). Os experimentos foram iniciados no 6º dia após o plaqueamento das células.

3.2.2 Ensaio experimentais

3.2.2.1 Metabolismo Celular

A viabilidade celular pode ser avaliada com base em várias funções celulares, como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, aderência celular, produção de ATP, produção de coenzimas e atividade de captação de nucleotídeos. Para este ensaio foi utilizado o teste colorimétrico com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (BAHUGUNA et al., 2017). Este método é baseado na redução do MTT (cor amarela) pelas enzimas oxido redutases celulares dependentes de NADPH em um precipitado denominado formazan (cor púrpura) (BERRIDGE et al., 2005) (Fig. 11).

As células saudáveis exibem altas taxas de redução do MTT para formazan, enquanto as células mortas ou inativas não conseguem fazê-lo. Assim, a alta intensidade da cor púrpura indica maior viabilidade celular, enquanto a diminuição na intensidade da cor púrpura significa um número reduzido de células ou células com baixo metabolismo e consequentemente menos viáveis e, portanto, a citotoxicidade da substância em questão (BAHUGUNA et al., 2017).

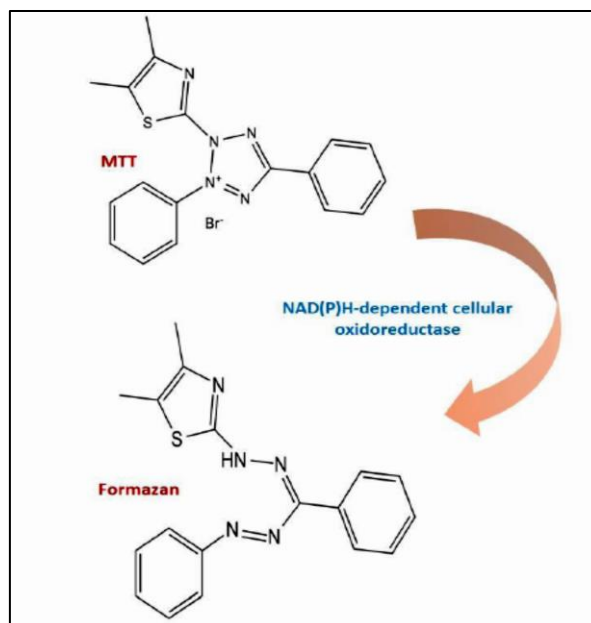


Figura 11. Representação da Redução do (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio Bromide (MTT) em formazan (BAHUGUNA et al., 2017).

Para avaliar a citotoxicidade do composto **1** e do diquat (DQ) foi seguida a metodologia adaptada por RIBEIRO et al. (2020). No 6º dia após o plaqueamento quando os neurônios se apresentavam diferenciados com desenvolvimento de neuritos e estabelecimento de redes sinápticas, o meio foi substituído por meio de manutenção fresco contendo o composto **1** solubilizado em DMSO (1%) nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (RIBEIRO et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2020) ou meio contendo o DQ nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 μM (ZHANG et al., 2012; COLLE et al., 2018). Os poços controles receberam meio de manutenção puro ou contendo DMSO a 1% como preconizado em estudos anteriores (LOGRADO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2020) (o meio contendo DMSO 1% não apresentou diferença estatística para os poços contendo meio de manutenção puro. Por isso, o DMSO 1% foi mantido como controle, nos testes *in vitro*, deste estudo). Após 3h, 24h, 48h e 72 horas de tratamento com o composto **1** ou 24 horas de exposição ao DQ, o meio de cultura foi substituído por meio contendo MTT (0,5mg/mL), as células foram incubadas por 6 horas a 37°C. Após esse tempo foi adicionado 100 μL de solução de solubilização (SDS) a 10% em cada poço para dissolver os cristais de formazan. As placas ficaram em temperatura ambiente por 16 horas e depois foi realizada a leitura dos poços na absorvância de 540 nm.

3.2.2.2. Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção intracelular de EROs foi estimada por ensaio de fluorescência, com o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (H₂DCFDA). O H₂DCFDA é um corante não fluorescente e permeável que se difunde prontamente nas células onde as esterases intracelulares hidrolizam o grupo acetato da molécula para produzir 2,7 - diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que fica preso dentro das células. As espécies reativas de oxigênio intracelulares oxidam o H₂DCF para formar o composto altamente fluorescente, 2,7-diclorofluoresceína (DCF) (RAJNEESH et al., 2017) (Fig. 12).

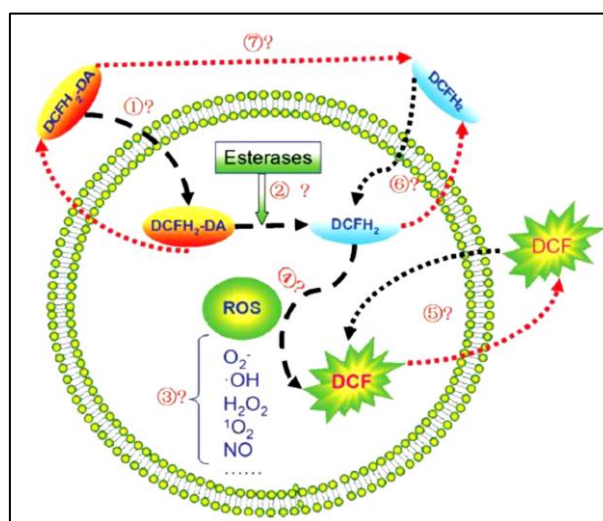


Figura 12. Mecanismo de ação do diacetato de 2, 7-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) (CHEN et al., 2010).

Para avaliar os níveis de EROs foi seguido o protocolo de Ribeiro et al. (2020). Resumidamente, as células foram plaqueadas, na densidade de 1×10^5 células/poço, em placa preta de 96 poços, de fundo chato e transparente. No 6º dia após o plaqueamento, as células foram tratadas com o composto **1** nas concentrações de 5, 10 e 25 μM por 24h. Após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por meio contendo DQ na concentração de $1 \mu\text{M}$. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida o meio foi substituído por meio contendo $150 \mu\text{L}$ da solução de H₂DCFDA ($2 \mu\text{M}$) por 45 minutos. Após esse tempo, os poços foram lavados três vezes com solução salina de Hank's livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (HBSS) incolor, sendo deixado o HBSS na terceira vez. Para a leitura foram utilizados os comprimentos de onda de 495 e 530 nm (excitação e emissão).

3.2.2.3. Peroxidação lipídica

Para os ensaios de peroxidação lipídica foi utilizada a sonda fluorescente BODIPY_{581/591} C11 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo de Ribeiro et al. (2020). A sonda é composta pelo ácido undecanóico 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3, com característica intensamente fluorescente e intrinsecamente lipofílica (DESCRIPTIONS, 2003).

Os neurônios foram plaqueados, na densidade de 1×10^5 células/poço, em placa de 96 poços preta, de fundo chato e transparente. No 6º dia após o plaqueamento, os neurônios receberam o tratamento com o composto **1** nas concentrações de 5, 10 e 25 μM por 24h. Após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por meio contendo DQ na concentração de $1 \mu\text{M}$. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida, o meio foi substituído pela solução com BODIPY_{581/591} C11 (2 μM). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 e a 37°C por 30 minutos. Em seguida os poços foram lavados três vezes com HBSS incolor, sendo deixado o HBSS na terceira vez. Para a leitura foram utilizados os comprimentos de onda de 530/590 nm (excitação/emissão) para fluorescência vermelha e 490/535 nm (excitação/emissão) para fluorescência verde.

3.3 Análises *in vivo*

3.3.1 Grupos experimentais e tratamento

Na primeira etapa dos estudos *in vivo*, 32 animais foram separados aleatoriamente compondo cada um dos grupos ($n=8$). GRUPO 1: controle; GRUPO 2: composto **1** (C1); GRUPO 3: diquat (DQ); GRUPO 4: composto **1** e DQ (C1+DQ).

Nos animais do grupo 1 (controle), foi administrada 100 μL de solução salina intraperitoneal em dose única. O grupo 2 (composto **1**) recebeu 100 μL de solução contendo composto **1** em diferentes concentrações (0,4 a 24 mg/kg) (MA et al., 2011; TIAN et al., 2016) dose única. O grupo 3 (diquat) recebeu 100 μL de solução de DQ (0,1 mMol/kg) (LU et al., 2010; HIGUCHI et al., 2011b) em dose única. Os animais do grupo 4 (composto **1** + DQ) recebeu 100 μL da solução do composto **1** (0,4 mg/kg) e, após 10 minutos (TIAN et al., 2016) 100 μL da solução de DQ (0,1 mMol/kg). Após 3 horas da injeção do DQ, os animais foram eutanasiados e os cérebros coletados para as análises bioquímicas e histológicas.

Na segunda etapa, outros 32 animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos contendo 8 animais cada. Foram seguidos os mesmos protocolos de tratamento da primeira

etapa. Após 3 horas da injeção do DQ, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

A figura 13 apresenta o delineamento experimental esquematizado.

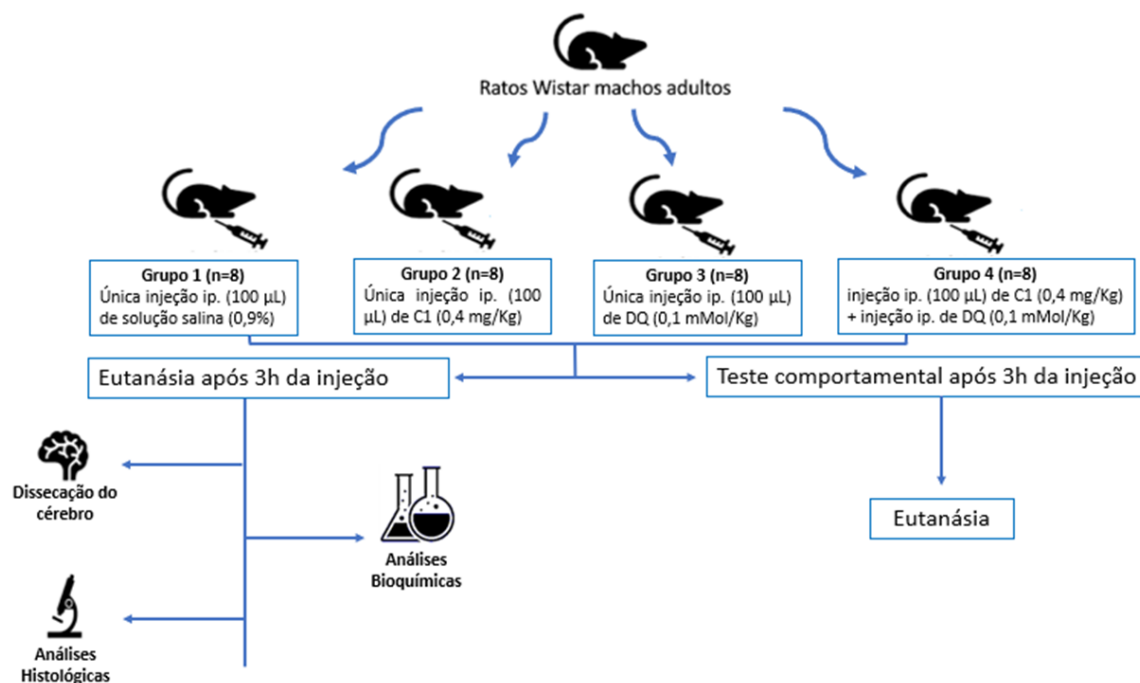


Figura 13. Delineamento experimental. No primeiro momento 32 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=8). Após 3h das injeções, os animais foram eutanasiados para dissecção do cérebro e posteriores análises bioquímicas e histológicas do hipocampo e córtex. No segundo momento, 32 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=8). Após 3h das injeções, os animais foram submetidos a testes comportamentais. (N=64)

3.3.2 Análises bioquímicas dos danos oxidativos

3.3.2.1 Processamento e homogeneizado tecidual

Após a coleta, o hipocampo e o córtex, foram pesados e imediatamente armazenados em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 4°C a uma velocidade de 13 000 RPM por 10 minutos (MIKRO 200R; Hettich lab technology, Tuttlingen, Alemanha) e o sobrenadante foi coletado. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -80° C para posteriores análises bioquímicas (MOLNAR et al., 2021).

3.3.2.2 Proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante Azul Brilhante de Coomassie BG-250, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm (ZAIA et al., 1998) medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA).

Para este ensaio, foi realizada a curva padrão da proteína albumina (0,5-10 µL) em duplicata. Resumidamente, pipetou-se 10 µL de albumina em cada ponto da curva de diluição da albumina (0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/mL) e 190 µL de corante Azul Brilhante de Coomassie diluído. Em seguida, pipetou-se na placa 10 µL da amostra diluída (20 µL amostra + 80 µL de água mili-Q) e 190 µL de corante Azul Brilhante de Coomassie diluído. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, a leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm.

3.3.2.3 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi medida por meio de um ensaio colorimétrico, baseado na atividade do pirogalol e da SOD (MARKLUND e MARKLUND, 1974). Para o preparo das placas foram utilizados 30 µL da amostra, 15 µL da solução de pirogalol e 99 µL de tampão de SOD. Em seguida 6 µL de uma solução de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio (MTT), foi adicionada aos poços para agir como agente colorimétrico da reação. A placa foi mantida à 37°C por 5 minutos. Após o período de incubação, foram pipetados 150 µL de DMSO em todos os poços e a placa foi levada para leitura da absorvância no aparelho VICTOR (Multidetector VICTORTM X3, Perkin-Elmer) a 595 nm.

3.3.2.4 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo do H₂O₂ a uma absorvância de 240 nm, representada por U/mg de proteína (AEBI, 1984). Resumidamente, em um béquer, foi preparado uma solução mix a qual era composta de 25 mL de tampão fosfato para 40 µL de H₂O₂ (30%). Foi adicionado a uma cubeta 30 µL da amostra e 970 µL do mix do tampão. As leituras das amostras foram feitas a 240 nm em espectrofotômetro com luz UV, por 60 segundos, sendo determinadas as absorvâncias do primeiro e do último

segundo para que a análise da atividade enzimática pudesse ser realizada. O tampão fosfato foi utilizado como branco. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorvância causada pelo desaparecimento do H₂O₂, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μMol de hidrólise de H₂O₂ por minuto, por mL, de acordo com a equação:

$$C = \frac{Abs}{\epsilon} \times \frac{1000}{VA}$$

Onde:

Abs = absorvância (0 seg – 60 seg)

ε = coeficiente de extinção molar em unidades de 39.4 M⁻¹ cm⁻¹;

VA = volume da amostra (1 mL);

C = concentração do peróxido de hidrogênio expressa em mol L⁻¹.

Os resultados foram expressos em unidade por miligrama (U/mg) de proteína.

3.3.2.5 Glutationa reduzida (GSH)

Para medir os níveis de glutathione reduzida foi feito um ensaio colorimétrico de acordo com o protocolo fornecido no kit comercial InvitroGen (Glutathione Colorimetric Detection Kit EIAGSHC). Primeiramente foram preparados os padrões para realização da curva padrão, por meio da diluição seriada do padrão de glutathione oxidada fornecido pelo kit.

Em seguida, foram pipetados 100 μL de SSA 5% a cada 50 μL de amostra para desproteinização. Os eppendorfs, contendo as misturas de amostra e SSA, foram incubados a 4°C por 10 minutos. Enquanto as amostras estavam incubando, foram preparados o reagente de detecção e o mix de reação conforme as instruções presentes no kit. O primeiro foi feito por meio da mistura de 140 μL do reagente de detecção concentrado a 1,26 ml do tampão de ensaio, já o segundo foi feito utilizando 140 μL de NADPH concentrado, 140 μL de Glutathione reductase concentrada e 1,12 ml de tampão de ensaio.

Após o período de incubação, foram pipetados, em duplicata, 50 μL dos padrões da curva e 50 μL das amostras desproteinizadas. A estes poços foram adicionados 25μL do reagente de detecção e 25 μL do mix de reação. Em seguida a placa com as amostras foram deixadas na bancada para incubar em temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final deste

tempo foi realizada a leitura no VICTOR (Multidetector VICTORTM X3, Perkin-Elmer) a 405 nm.

3.3.2.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método descrito em Draper et al. (1993). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do TBA em se ligar a lipídeos oxidados (BEZERRA et al., 2004). Resumidamente, 500 µL da amostra foi misturado com 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCL 0,25N), 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% em ácido acético 0,25M) e 125 µL de butilhidroxitoluol (BHT) (125 mM em etanol), aquecido por 15 min a 95° e em seguida colocado em 5 minutos de banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. A água destilada foi utilizada como branco. Os níveis de TBARS foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA ($15400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nanomol por miligrama (nM/mg) de proteína.

3.3.2.7 Proteína carbonilada

A oxidação de proteínas pelas espécies reativas de oxigênio leva a formação de derivados carbonílicos que podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (LUSHCHAK, 2007). A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada consistiu em analisar espectrofotometricamente a reação do DNPH com grupos carbonílicos, gerando a hidrazona correspondentes (LEVINE et al., 1994) e foi utilizado o protocolo modificado descrito por (REZNICK e PACKER, 1994). Para isso, 500 µL do homogeneizado foi colocado em tubos e foi adicionado a esses todos 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) (10%), misturados no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 µL de DNPH. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos foram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 µL de TCA e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi

descartado e adicionado 1 mL de Dodecil Sulfato de sódio (6%) aos tubos. As amostras foram misturadas no vórtex e centrifugadas à 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer, obtendo os resultados em nmol/g de tecido.

3.3.3 Análise morfológica

Para a análise morfológica os hipocampos previamente fixados em solução de formol 10% tamponado, foram desidratados em séries crescentes de álcoois, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto (NOGUEIRA et al., 2011) e incluídos em resina acrílica conforme protocolo indicado no kit de meio de inclusão comercial (Historesin Leica). Após a inclusão do material, secções de 3 µm foram feitas em micrótomo semiautomático (EasyPath-20094), a partir do bregma – 2,64 mm (WATSON e PAXINOS, 2004). Para cada animal foram feitas cinco lâminas contendo seis cortes cada. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% (BERGHOLT et al., 2019) e as lâminas montadas com o meio de montagem Entellan® (Merk) para serem analisadas.

Após a montagem, as lâminas foram fotografadas (primeiro e último corte de cada lâmina) com uma câmera digital (AmScope MU300). As células das áreas do Corno de Ammon (CA1-CA4) e do giro denteado foram contadas (calculado a média de células de cada área) e a presença de neurônios saudáveis e de neurônios lesionados (POIRIER et al., 2000) foi aferida utilizando o software ImageJ (1.43; NIH, Bethesda, MD, USA).

3.3.4 Teste comportamental

3.3.4.1 Campo aberto

O teste tem como finalidade avaliar atividade locomotora durante a exploração do ambiente, onde o animal encontra-se em uma situação nova, e o perfil ansioso. O perfil ansioso ou comportamento “semelhante à ansiedade” são assim chamados porque se assemelham a comportamentos de ansiedade em humanos (WALKER e DAVIS, 2008). O exame extensivo de áreas do cérebro que medeiam medo versus ansiedade sugere que a amígdala medeia comportamentos semelhantes ao medo para pistas aversivas, discretas e proximais, enquanto o núcleo da estria terminal medeia comportamentos semelhantes a ansiedade ou preocupação (DAVIS, 2010). Essas duas áreas cerebrais regulam uma à outra

para coordenar a ativação de regiões cerebrais que medeiam resultados comportamentais e fisiológicos semelhantes (LEZAK et al., 2017).

Para os testes foi utilizada uma caixa, marcadas com 16 quadrantes, que possuía paredes altas que impossibilitavam a saída do animal da arena (Fig. 14). Este aparato ficava localizado em uma sala isolada, silenciosa, iluminada com luz alta, adequada para testes comportamentais. Ao final do teste com cada animal o aparato era higienizado com álcool 20% para evitar viés no teste por influência de cheiro de outro animal (HALL, 1934; BAILEY e CRAWLEY, 2009; DE NORONHA et al., 2017). No teste, o animal foi colocado com cuidado no centro da arena e o número de quadrantes percorridos pelo animal durante 5 minutos foram quantificados e anotados para avaliar a locomoção do animal. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado quantificando o tempo de permanência do animal nos quadrantes centrais em relação ao tempo total no aparato (LEZAK et al., 2017).

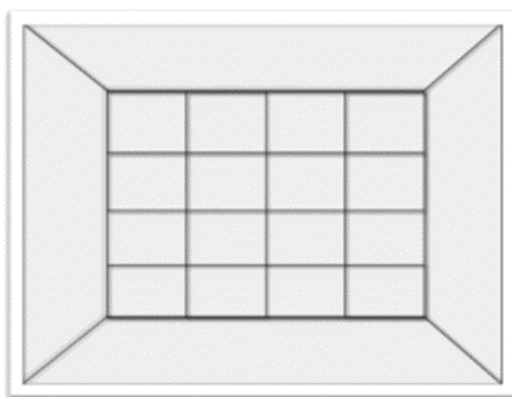


Figura 14. Esquema do Campo aberto (38cm de comprimento, 31cm de largura, 23cm de altura) (CHIRICO, 2017).

3.4 Análise estatística

Os resultados das análises *in vitro* e *in vivo* passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e por isso foram comparados pela análise de variância (ANOVA), de um fator (One-way ANOVA) ou de dois fatores (Two-way ANOVA), quando apropriado, seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para o valor $p \leq 0,05$. Os valores numéricos foram colocados sob a forma média e erro padrão da média (EPM).

Todos os resultados foram inseridos no software GraphPad Prism versão 5.0 para obtenção dos dados estatísticos e dos gráficos representativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo *in vitro*

O efeito antioxidante do composto **1**, nas concentrações de 5 a 200 μM , foi avaliado sobre o metabolismo celular em culturas primárias de neurônios hipocampais através do teste do MTT, nos tempos de 3, 24, 48 e 72 horas após o tratamento (Fig. 15). Foi observado uma redução significativa no metabolismo neuronal na concentração de 200 μM com 3h de exposição ao composto **1** (Fig. 15A). Com o aumento do tempo de tratamento para 24h foi observado que a concentração de 50 μM do composto **1** reduziu o metabolismo celular (Fig. 15B). No entanto, em concentrações menores (5, 10 e 25 μM), o composto **1** não reduziu o metabolismo em nenhum dos tempos avaliados (Fig. 15).

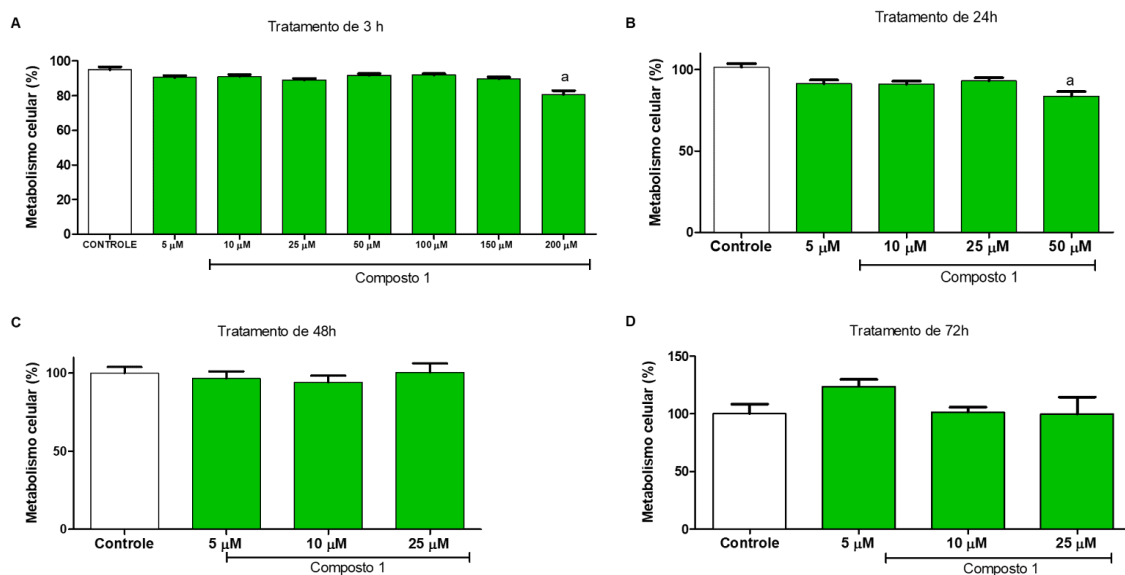


Figura 15. Metabolismo celular. Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram tratados com composto **1** (5 μM - 200 μM) nos tempos de 3h, 24h, 48h e 72h. Para o ensaio foi utilizado o teste colorimétrico com MTT. Barras representam média \pm EPM. A Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$). (a) diferença estatística do grupo controle (DMSO 1%).

O efeito do diquat (DQ) também foi avaliado através da exposição das culturas primárias de neurônios a diferentes concentrações (0,1-10 μM) no tempo de 24h (ZHANG et al., 2012; COLLE et al., 2018) (Fig. 16). Uma redução significativa do metabolismo celular foi observada nas culturas expostas à concentração de 10 μM (Fig. 16). Os resultados dos testes de MTT foram utilizados para determinar as concentrações do composto **1** e do DQ nas avaliações subsequentes dos níveis intracelulares de EROs e de peroxidação lipídica. A concentração subtóxica de 1 μM de DQ foi determinada para provocar insultos no

metabolismo dos neurônios. O composto **1** foi utilizado nas concentrações de 5, 10 e 25 μM por 24h, como tratamento prévio à exposição ao DQ por 24h.

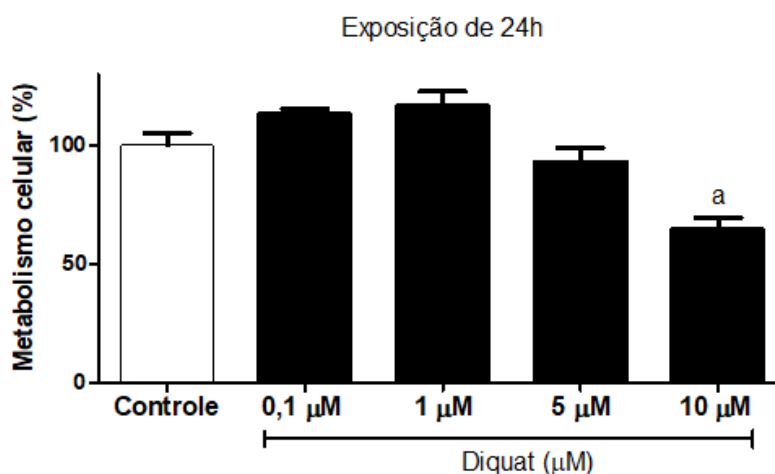


Figura 16. Metabolismo celular. Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram expostos a 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM de diquat por 24h. Para o ensaio foi utilizado o teste colorimétrico com MTT. Barras representam média \pm EPM. Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$). (a) diferença estatística do grupo controle (meio de cultura).

A dose de tratamento de um antioxidante deve ser capaz de atenuar os processos oxidativos sem gerar danos às células, assim o composto **1** foi avaliado quanto à sua capacidade de gerar EROs no meio intracelular. Os resultados mostram que o tratamento dos neurônios somente com o composto **1** nas concentrações de 5, 10 e 25 μM por 24h, não aumentou os níveis intracelulares de EROs (Fig. 17A), justificando sua utilização nas concentrações testadas.

Após a padronização das concentrações do composto **1** e do DQ as culturas primárias de neurônios foram expostas por 24h ao DQ (1 μM) e foi observado um aumento significativo dos níveis intracelulares de EROs (Fig. 17B). No entanto, nas células previamente tratadas por 24h com 10 e 25 μM do composto **1**, e expostas ao DQ (1 μM) não houve aumento dos níveis intracelulares de EROs em comparação com o grupo controle (Fig. 17B) o que mostra que o composto **1** exerceu atividade antioxidante impedindo o aumento intracelular das EROs. Esses resultados corroboram os achados de Ribeiro et al. (2020) que, utilizando o peróxido de hidrogênio como agente indutor do desequilíbrio redox, também observou a ação antioxidante e neuroprotetora do composto **1** em culturas primárias de neurônios hipocampais.

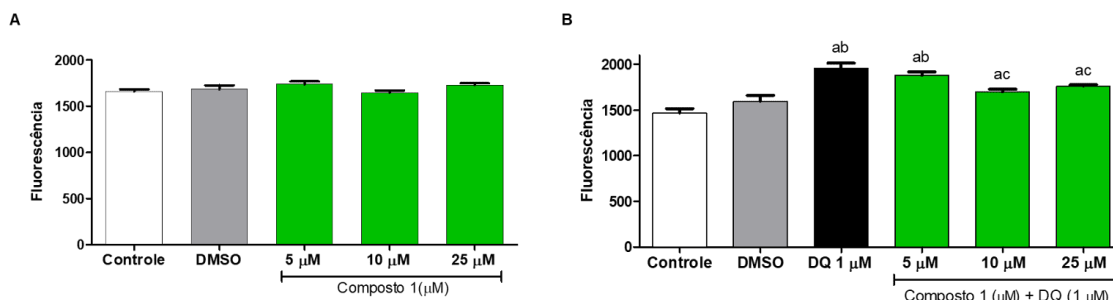


Figura 17. Níveis intracelulares de EROs. (A) Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram tratados com composto **1** nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 25 μM por 24h. (B) Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram tratados com composto **1** nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 25 μM por 24h, em seguida, expostos a 1 μM de diquat por 24h. A produção intracelular de EROs foi estimada por ensaio de fluorescência, com a sonda H_2DCFDA . Barras representam média \pm EPM. Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$). (a) diferença estatística do grupo controle; (b) diferença estatística do grupo DMSO (1%); (c) diferença estatística do grupo exposto ao diquat sem tratamento.

Um dos principais produtos do desequilíbrio redox mediado por radicais livres sobre os neurônios é a peroxidação dos lipídios de membrana, devido à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados no cérebro em comparação com outros órgãos (MONTINE et al., 2002; IBRAHIM et al., 2018). Para excluir a possibilidade do próprio composto **1**, nas concentrações de 5, 10 e 25 μM , gerar peroxidação lipídica, avaliamos seus efeitos sobre os neurônios. Após observar que o composto **1** isolado não causa peroxidação lipídica (Fig. 18A), avaliamos a peroxidação lipídica gerada pela exposição dos neurônios a 1 μM de DQ por 24h. O resultado mostrou que o DQ elevou significativamente os níveis de peroxidação lipídica (Fig. 18B), provavelmente relacionado à reação dos radicais livres formados com os hidrogênios alílicos dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (MAGALHÃES et al., 2018). A partir desses resultados avaliamos a peroxidação lipídica em neurônios previamente tratados com o composto **1** por 24h e submetidos a danos redox pela exposição ao DQ. Foi observado que o composto **1** foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica de forma significativa na concentração de 10 μM (Fig. 18B)

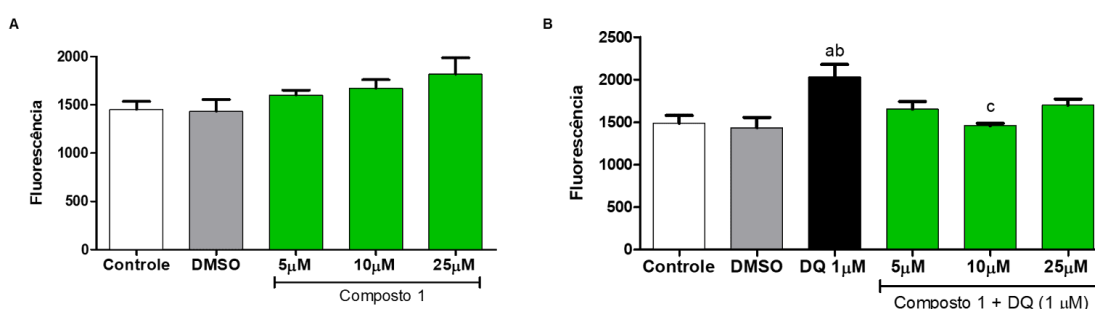


Figura 18. Peroxidação lipídica. (A) Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram tratados com composto **1** nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 25 μM por 24h. (B) Neurônios do hipocampo de ratos Wistar foram

tratados com composto **1** nas concentrações de 5 μM , 10 μM e 25 μM por 24h, em seguida, expostos a 1 μM de diquat por 24h. A peroxidação lipídica foi mensurada com a sonda fluorescente BODIPY581/591 C11. Barras representam média \pm EPM. Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$). (a) diferença estatística do grupo controle; (b) diferença estatística do grupo DMSO (1%); (c) diferença estatística do grupo exposto ao diquat sem tratameto.

O aumento nos níveis intracelulares de EROs e, conseqüentemente, a peroxidação lipídica observados nesse estudo ocorrem porque, o DQ, utiliza o oxigênio molecular para produzir radical ânion superóxido e, subseqüentemente, peróxido de hidrogênio que pode se decompor no radical hidroxila (YUAN et al., 2007; LU et al., 2010). Todas essas espécies reativas podem participar de reações de oxidação, gerando a quebra da cadeia de DNA, inativação de enzimas, e até mesmo a morte celular. (COHEME e MURPHY, 2008; GAWARAMMANA e BUCKLEY, 2010; HALLIWELL e GUTTERIDG, 2015).

4.2 Estudo *in vivo*

4.2.1 Bioquímica

Para complementar os estudos *in vitro* sobre a atividade antioxidante do composto **1**, avaliamos a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas em ratos Wistar tratados com composto **1** e expostos ao diquat. Como é sabido, os antioxidantes fenólicos perdem sua atividade em altas concentrações e se comportam como pró-oxidantes (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Por isso, foi determinada, inicialmente, a concentração do composto **1** que, isoladamente, não acarreta danos oxidativos ao tecido cerebral. Os resultados mostram que os animais que receberam o composto **1** em doses próximas àquelas encontradas na literatura para outros derivados de isobenzofuranonas (12 e 24 mg/Kg) apresentaram níveis de peroxidação lipídica estatisticamente maiores, no hipocampo e no córtex, que os animais do grupo controle (Fig. 19). No entanto, aqueles que receberam doses mais baixas (0,4 e 3 mg/Kg) não apresentaram elevação nos níveis de peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas, sendo a dose de 0,4 mg/Kg a selecionada, neste estudo, para o tratamento prévio dos animais.

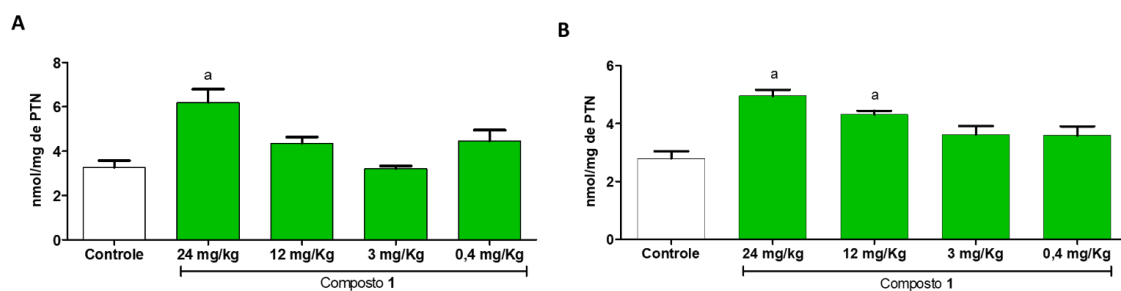


Figura 19. Peroxidação lipídica. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após o tratamento com o composto **1**. A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Após determinada a dose de tratamento, os animais receberam intraperitonealmente 100 μ L do composto **1** e, após 10 minutos, os animais foram expostos a 0,1 mMol/kg de DQ (HIGUCHI et al., 2011). A análise do hipocampo e do córtex mostrou que os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD), considerada uma enzima de linha de frente no combate aos ânions superóxido, foram reduzidos nos grupos expostos ao DQ com e sem o tratamento prévio com o composto **1** (Fig. 20A). Nossos resultados corroboram o estudo de Lu et al. (2010), quanto à redução da SOD no plasma, fígado e rim de animais expostos ao DQ.

A redução da atividade da SOD no tecido nervoso pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles à saturação da atividade enzimática diante da dismutação de grandes quantidades de íons superóxido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Esse cenário também acarretaria o acúmulo de íons superóxido que podem atuar sobre a estrutura tridimensional da SOD, promovendo a perda de sua função (BARREIROS e DAVID, 2006; ROCHA et al., 2008). Além disso, o excesso de peróxido de hidrogênio, gerado pela dismutação de ânions superóxido, poderia estar atuando diretamente sobre o componente metálico, o cobre presente no sítio ativo da SOD, desencadeando uma ação pró-oxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

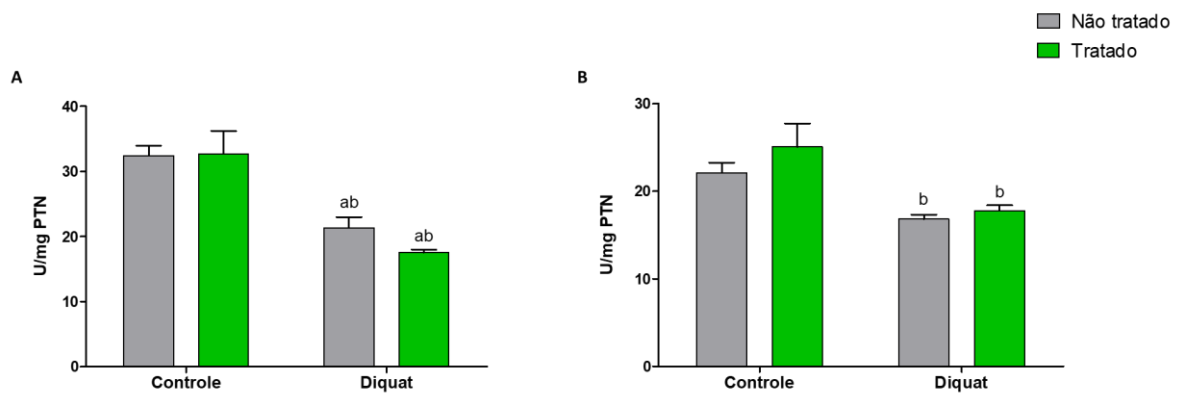


Figura 20. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após a exposição ao diquat. Atividade da SOD foi medida pelo ensaio colorimétrico, baseado na atividade do pirogalol e da SOD. (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

O aumento do peróxido de hidrogênio não foi confirmado pela análise da atividade enzimática da catalase (CAT) no hipocampo (Fig. 21A), porém foi observado o aumento da atividade da enzima no córtex dos animais expostos ao DQ sem tratamento (Fig. 21B). Ademais, os animais previamente tratados com o composto **1** e expostos ao DQ não apresentaram aumento da atividade da CAT na região do córtex (Fig. 21B). Esta enzima, assim como a GPx, é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água, e normalmente atua sobre peróxidos (URSINI et al., 1995; KUHN e BORCHERT, 2002).

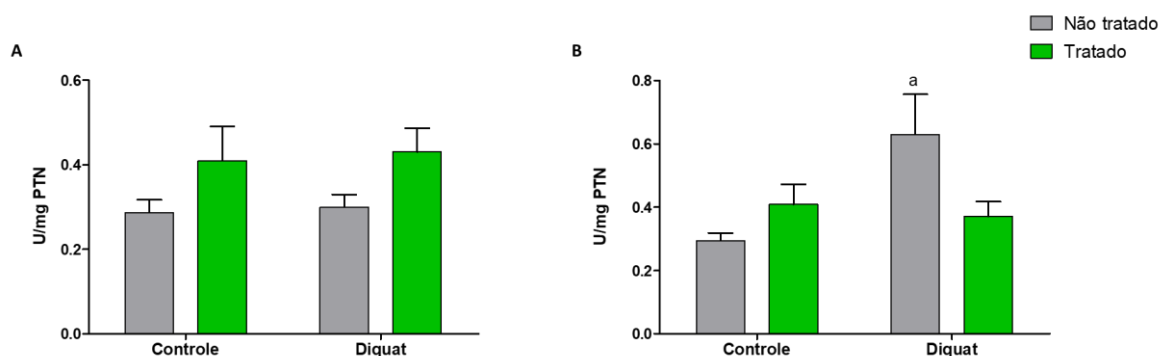


Figura 21. Atividade da enzima catalase (CAT). Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após a exposição ao diquat. Atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo do H_2O_2 na absorvância de 240 nm. (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para avaliar a peroxidação lipídica, o nível da glutathiona reduzida (GSH) foi mensurado, analisando assim, indiretamente, a atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Foi observado um aumento da GSH no hipocampo e no córtex dos animais tratados com o composto **1** e expostos ao DQ (Fig. 22). Além disso, assim como no caso das outras enzimas mencionadas, a GSH não foi alterada pelo tratamento isolado com o composto **1** nos tecidos analisados (Fig. 22).

O tripeptídeo GSH é um antioxidante não enzimático típico, presente em concentrações mM em células eucarióticas e em muitas células procarióticas (HALLIWELL e GUTTERING, 2015). Os principais papéis protetores da glutathiona na luta contra o desequilíbrio redox são eliminar radicais hidroxila e moléculas de oxigênio singlete, desintoxicar o peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos por meio da ação catalítica da glutathiona peroxidase, participando do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e regenerando antioxidantes como a vitaminas C e E, de volta às suas formas ativas (MASELLA et al., 2005). É sabido que o desequilíbrio redox é um mecanismo importante de toxicidade induzida por DQ, possivelmente devido à depleção de GSH (SMITH et al., 1985). Com isso, a depleção de GSH parece ser o principal fator que permite a peroxidação lipídica.

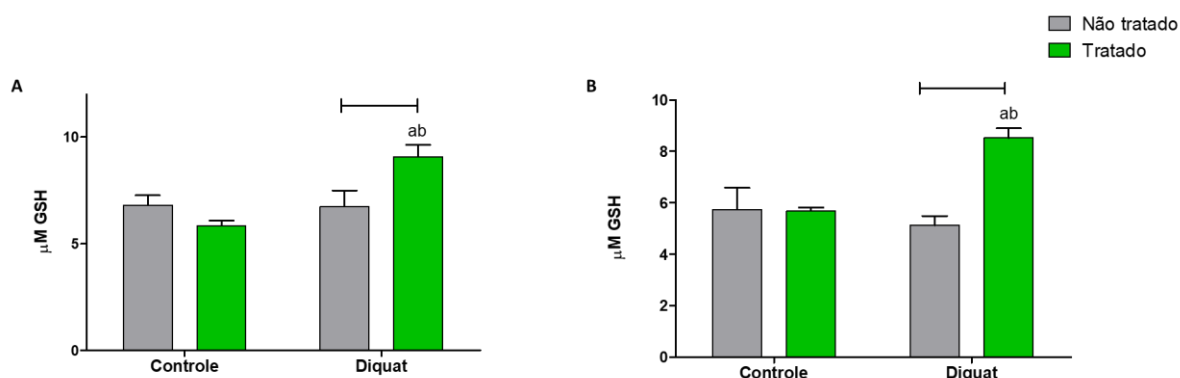


Figura 22. Nível da glutathiona reduzida (GSH). Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após a exposição ao diquat. A GSH foi mensurada com kit colorimétrico Glutathione Colorimetric Detection (InvitroGen). (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

No presente estudo, não foi observado o declínio da GSH em ratos expostos ao DQ quando comparado com controle (Fig. 22), entretanto, os níveis de peroxidação lipídica do grupo exposto ao DQ sem tratamento estavam maiores que o grupo controle no hipocampo

e córtex (Fig. 23). Contrariamente, o nível de peroxidação lipídica, se aproximou do fisiológico nos animais tratados com composto **1** e expostos ao DQ (Fig. 23). Esses resultados corroboram o estudo de Yousef et al. (2009), que mostrou que a depleção de GSH resultou em peroxidação lipídica aumentada, e a peroxidação lipídica excessiva causou aumento no consumo de GSH. Sendo assim, a restauração a níveis normais da peroxidação lipídica, pelo composto **1**, no hipocampo e no córtex, pode ser devido a um aumento de GSH, e da ação direta do composto **1**, sobre as EROs, evidenciada nos ensaios *in vitro*. Com isso, sugere-se que o composto **1** manteve o equilíbrio redox de EROs de forma indireta através do sistema enzimático, bem como do sistema de defesa antioxidante não enzimático.

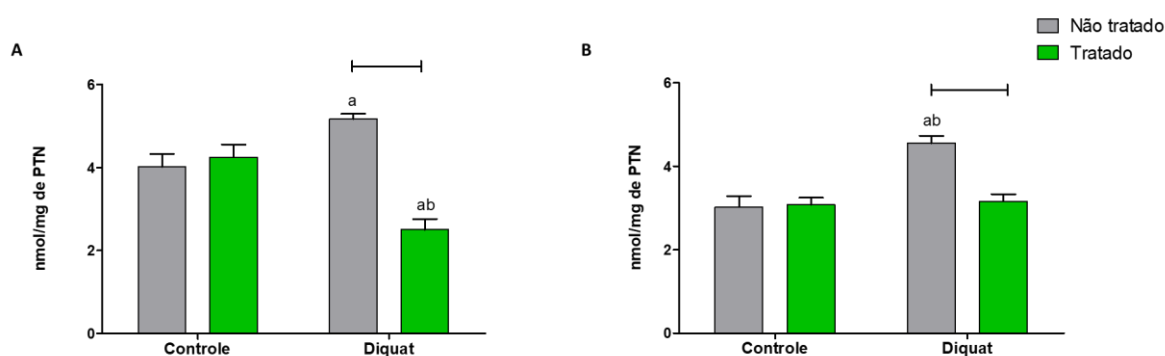


Figura 23. Peroxidação lipídica. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após a exposição ao diquat. A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Além dos lipídios das membranas celulares, as proteínas também são alvo das EROs. A oxidação proteica é uma modificação covalente induzida diretamente pelas espécies reativas ou indiretamente por reação com produtos secundários de processos redox (DALLE-DONNE et al., 2006). Por isso, as proteínas carboniladas são um bom biomarcador de dano oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2003). Diante do exposto, analisamos os níveis de proteínas carboniladas em amostras de hipocampo e córtex de ratos tratados com o composto **1** e expostos ao DQ.

Os resultados mostram que os animais expostos ao DQ sem tratamento apresentaram, no hipocampo, níveis de proteínas carboniladas superiores aos animais do grupo controle (Fig. 24A). Além disso, os animais tratados com o composto **1** e expostos ao DQ apresentaram níveis de proteínas carboniladas inferiores aos animais do grupo controle no hipocampo e córtex (Fig. 24). Esses resultados indicam que o composto **1** pode conferir proteção antioxidante a tecidos cerebrais reduzindo os danos às proteínas, o que o torna de

grande relevância, uma vez que, muitas doenças neurodegenerativas estão diretamente associadas ao acúmulo de agregados de proteínas carboniladas nos tecidos (DALLE-DONNE et al., 2003).

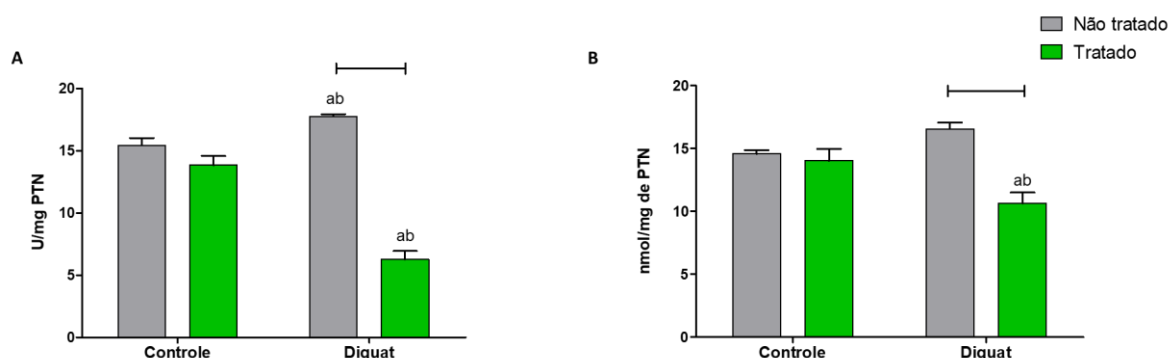


Figura 24. Proteínas Carboniladas. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Dissecção do cérebro 3h após a exposição ao diquat. A concentração sérica de proteína carbonilada foi analisada espectrofotometricamente pela reação do DNPH com grupos carbonílicos, gerando a hidrazona correspondentes. (A) Hipocampo; (B) Córtex. Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

O DQ, ao ser metabolizado por vários sistemas enzimáticos (NADPH-citocromo P450 redutase, NADH-ubiquinona oxidoreductase e óxido nítrico sintase (NOS)) (DAY et al., 1999; RANJBAR et al., 2018) gera um radical DQ^+ (monocátion). Esse radical é rapidamente oxidado para DQ^{2+} que, no processo, gera superóxido (O_2^-). Além disso, ele pode se decompor em outros radicais livres como o dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila promovendo a peroxidação dos lipídios de membranas celulares (DJUKIC et al., 2012).

A proteção conferida pelo composto **1** pode ser devido aos compostos fenólicos serem antioxidantes primários, que são principalmente eliminadores de radicais livres que atrasam ou inibem a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da oxidação lipídica (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). A proteção conferida pelo composto **1** pode ocorrer pela sua capacidade de eliminar o excesso de radical OH^\cdot que pode estar reagindo com o grupo benzila em uma reação de compartilhamento de elétrons, formando uma molécula de água e uma estrutura estável que continua realizando o mecanismo de ressonância com o restante da molécula (Fig. 25) (TEIXEIRA et al., 2020). Outra possibilidade de reação com a forma radicalar hidroxila seria uma reação de adição nucleofílica na qual, o ácido ftalaldeídico formado estaria em constante equilíbrio formando

uma molécula cíclica, o hemiacetal (Fig. 26). (SOLOMONS e FRYHLE, 2000; TEIXEIRA et al., 2020).

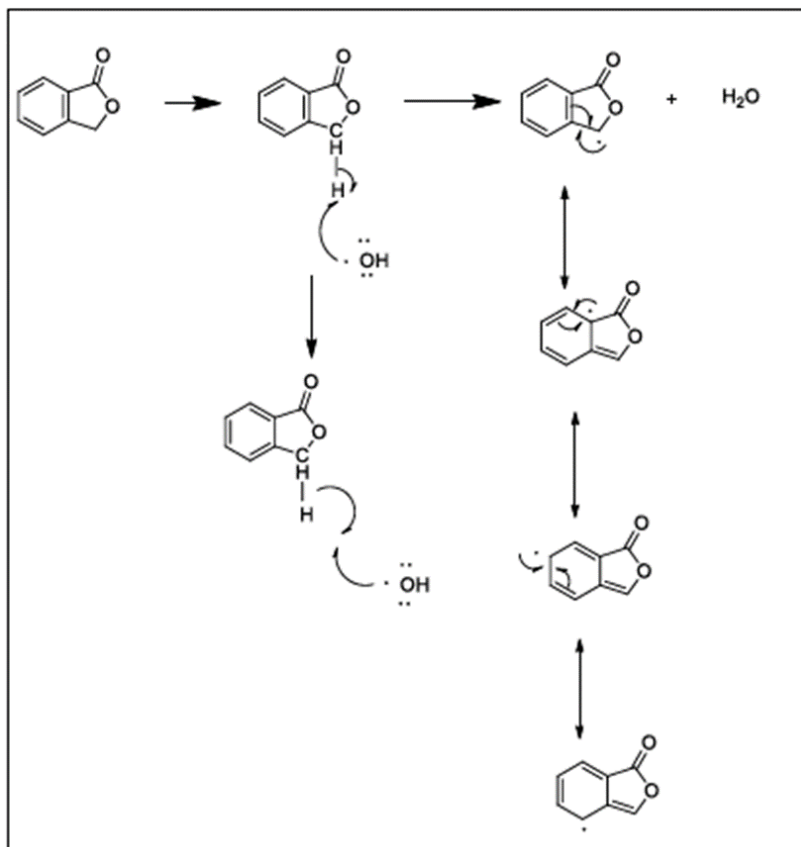


Figura 25. Reação de compartilhamento de elétrons. O grupo benzila presente no composto **1** compartilharia elétrons com o radical OH^\cdot levando a formação de uma molécula de água e o mecanismo de ressonância promoveria a estabilidade da molécula.

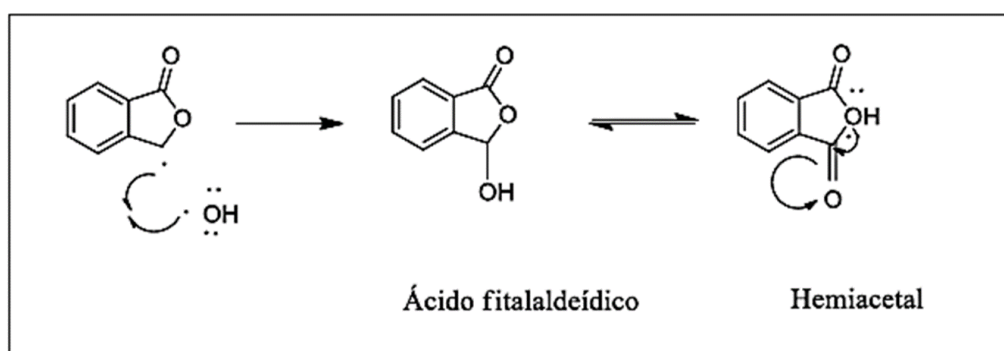


Figura 26. Reação de adição nucleofílica. O excesso de OH^\cdot produzido seria utilizado na reação de adição nucleofílica e acoplado à molécula ftalídica levando a formação do hemiacetal, mais estável e menos tóxico ao organismo.

A proteção do composto **1** também pode ocorrer de maneira indireta pois, com a sua atividade antioxidante, diminuindo os níveis intracelulares de EROs, o composto **1** minimiza a oxidação de proteínas (Fig. 24). Dessa forma, acredita-se que o composto **1** auxilie na remoção de EROs, através dos mecanismos propostos e minimiza os danos oxidativos causados pelo excesso dessas espécies favorecendo a ação da glutatona peroxidase ao elevar o nível de GSH, atuando assim, em conjunto com o sistema enzimático endógeno.

4.2.2 Morfologia hipocampal

A estrutura tecidual preservada é de suma importância para o pleno funcionamento dos processos fisiológicos do sistema nervoso. Por isso, para avaliar o efeito do tratamento com o composto **1** na estrutura tecidual do hipocampo, o hemisfério direito dos animais foi coletado, para subsequente análise estereológica. Um bom parâmetro de avaliação morfométrica é a contagem do número de células. Por isso, as regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e o GD foram avaliadas quanto à presença de *dark neurons* (DN) em relação ao número total de células. A presença aumentada de DN, é um indicativo de dano neuronal causado pela neurodegeneração, estando comumente associada a danos oxidativos em lesões decorrentes da hipóxia, criogenia e intoxicação por pesticidas (OHTSUKA e MURAKAMI 1996; JORTNER, 2006; VASILEV et al., 2018).

De maneira geral, os resultados mostram que os animais expostos ao DQ sem tratamento prévio apresentam aumento de DN em todas as áreas do hipocampo (Fig. 27 e 28), com exceção da região CA3 (Fig. 27C e Fig. 28). Esse aumento de DN foi revertido pelo tratamento com o composto **1** na região CA1 (Fig. 27A e Fig. 28) e atenuado no giro denteado, uma vez que não houve diferença estatística entre o grupo tratado somente com o composto **1** e o grupo tratado e exposto ao DQ (Fig. 27E). De acordo com Pizzino et al. (2017) a exposição a substâncias exógenas, com consequente produção de EROS, pode acarretar danos oxidativos que levam à lesão neuronal, corroborando resultados encontrados no grupo exposto ao DQ neste trabalho.

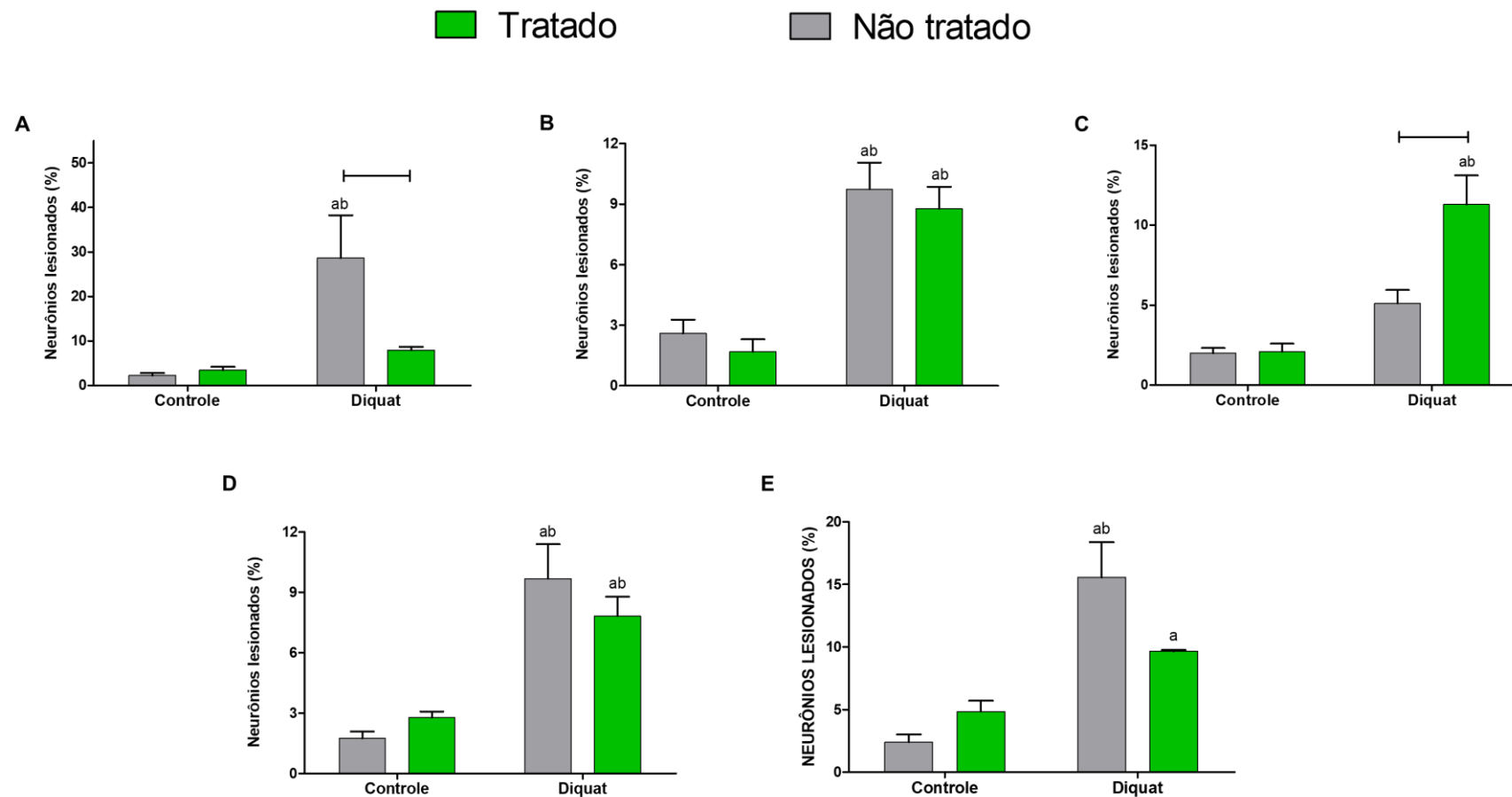


Figura 27. Dark Neuros. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Eutanásia e retirada do cérebro 3h após a exposição ao diquat. (A) CA1; (B) CA2; (C) CA3; (D) CA4; (E) Giro denteado. Barras representam média ± EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

A região CA1, é uma continuação do subículo com neurônios piramidais pequenos e dispersos. Esta região exerce importante papel na compreensão de sequências temporais para formar contextos espaciais (KESNER, et al., 2004). Comparativamente, foi a área que parece ter sofrido maior influência do DQ (Fig. 26A). Segundo Nitatori et al. (1995) este setor é seletivamente vulnerável a danos isquêmicos, onde neurônios podem sofrer morte celular dias após a lesão. A região CA2, é uma área proeminente e distinta principalmente em seres humanos (HITTI e SIEGELBAUM, 2014). Perda neuronal na região CA2 podem estar associadas ao estresse e lesões excitotóxicas (BENES, 1999). Segundo Francine (1999) em pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar há perda evidente e preferencial dos neurônios piramidais em CA2 evidenciadas no cérebro pós-morte. Apesar de se conhecer relativamente pouco sobre as propriedades de CA2, Frederick e Steven (2014), mostraram que a região CA2 é essencial para a memória social e que danos nessa área podem estar relacionados à déficit profundo no reconhecimento social (HITTI e SIEGELBAUM, 2014).

A região CA3 corresponde à curva do hipocampo, direcionando os neurônios para a abertura do GD. A literatura mostra vulnerabilidade da região CA3 em cérebros de animais expostos a agentes danosos (GIACINTO et al., 2004; BELVINDRAH et al., 2014). Observamos neste estudo que o DQ isoladamente não gerou danos significativos à região CA3, entretanto, observamos maior vulnerabilidade dessa região à exposição ao DQ associada ao tratamento com o composto **1**. Esta sub-região desempenha um papel importante na codificação de novas informações espaciais na memória de curto prazo e de suporte no circuito neural por sua eferência via fórnix (KESNER, 2007). A região CA4 está no hilo do giro denteado e, neste estudo, apresentou aumento significativo de DN na exposição ao DQ, com e sem tratamento com o composto **1** (Fig. 27D e Fig. 28), assim como a região CA2. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen et al. (2010), e assim como a região CA2, sua função específica não é bem definida, porém sabe-se que ela também participa dos circuitos sinápticos do hipocampo e lesões nesta área podem afetar a plasticidade hipocampal (KIM e DIAMOND, 2002).

Segundo Djukic et al. (2012) alterações decorrentes de processos redox desencadeado pelo DQ foram observadas no córtex de ratos Wistar. De forma análoga, as alterações no hipocampo observadas neste estudo, provavelmente são decorrentes da exposição ao herbicida bupiridílico. Porém, esse resultado mostra que, apesar da redução da peroxidação lipídica e das proteínas carboniladas observada nos estudos *in vitro* e

bioquímico (*in vivo*), o tratamento com o composto **1** não foi suficiente para reduzir a morte neuronal na maioria das regiões hipocâmpais. O aumento de DN observado nos grupos expostos ao DQ pode acarretar danos nas informações que são processadas no hipocampo através de várias rotas paralelas envolvendo suas sub-regiões (HITTI e SIEGELBAUM, 2014). Na via trissináptica clássica, a informação procede do córtex entorrinal para o giro denteado, em seguida para CA3 e depois para CA1, a principal saída do hipocampo (VAN STRIEN et al., 2009; HITTI e SIEGELBAUM, 2014). Por isso, lesões nessas regiões podem gerar prejuízos cognitivos envolvendo a consolidação de informações, prejudicando o aprendizado e a memória (TSIEN et al., 1996; NAKASHIBA et al., 2008).

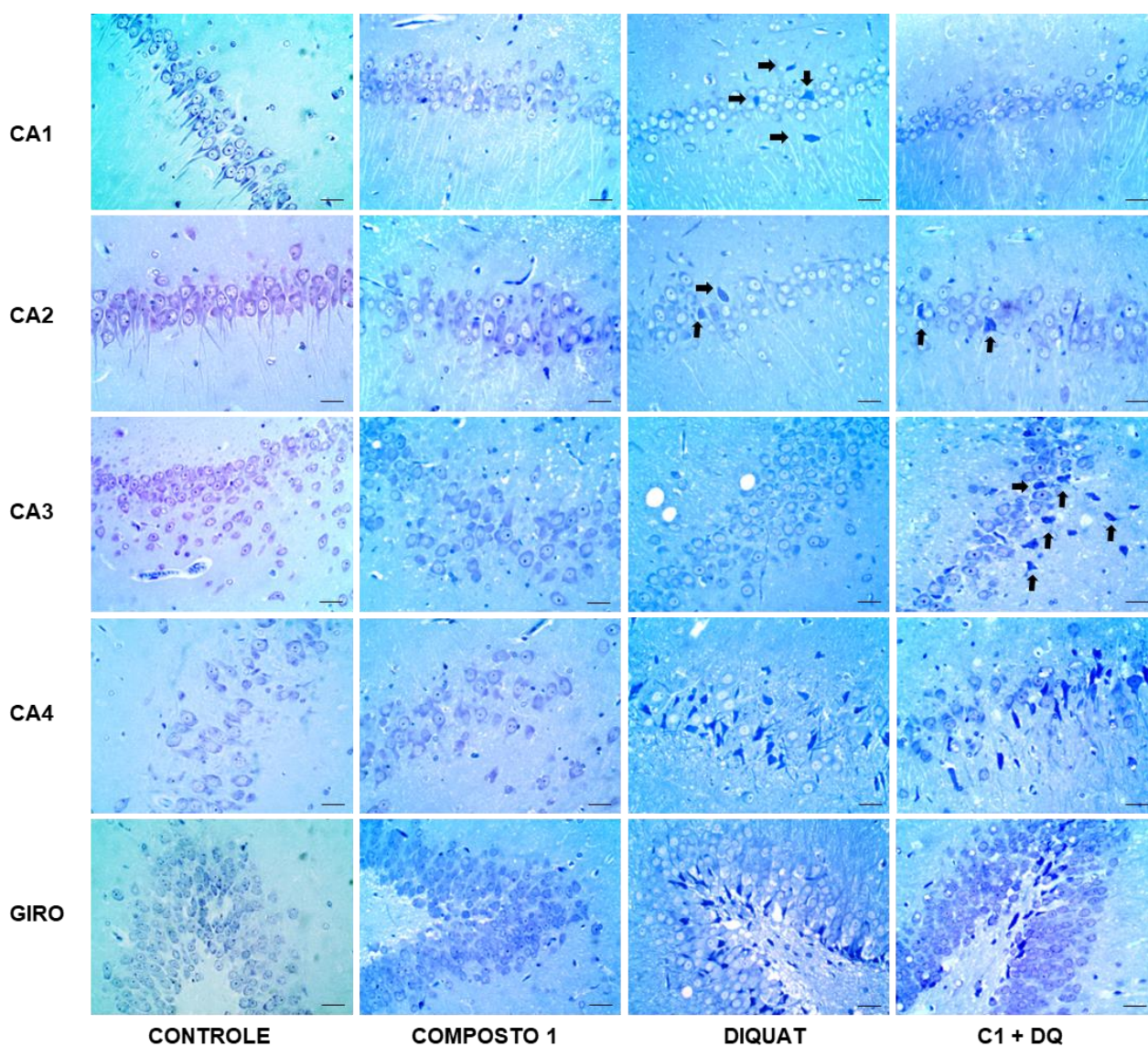


Figura 28. Imagens das regiões do hipocampo de ratos Wistar. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Eutanásia e retirada do cérebro 3h após a exposição ao diquat. Grupo tratado com salina (controle); grupo tratado com 0,4 mg/kg do composto **1**

(composto **1**); animais expostos a 0,1 mM/kg de diquat (diquat); animais tratados com 0,4 mg/kg do composto **1** e expostos a 0,1 mM/kg de diquat (C1+DQ). Aumento de 400x. Coloração de azul de toluidina.

4.2.3 Avaliação comportamental

Alterações bioquímicas e danos teciduais no hipocampo podem gerar comprometimentos cognitivos e distúrbios comportamentais, como transtorno de ansiedade (BRANDÃO et al., 2003; RAO et al, 2009; COMINSKI et al., 2014). Para avaliar o comprometimento da memória e a ansiedade, foi necessário realizar o teste da capacidade motora, pois o DQ, assim como o PQ, ao atravessar a barreira hematoencefálica, causa a degeneração de células dopaminérgicas da substância negra, resultando na indução de déficits motores (MCCORMACK et al., 2002; THIRUCHELVAM et al., 2003; MCCORMACK et al., 2005). Para avaliação da capacidade motora dos animais foi utilizado o teste de campo aberto (Fig. 29). Os resultados demonstram que houve redução na locomoção (números de cruzamentos) dos animais expostos ao DQ em relação ao grupo controle. Foi possível identificar que o tratamento com o composto **1**, isoladamente, não altera a locomoção dos animais. Entretanto, o tratamento com o composto **1** não foi capaz de melhorar a locomoção dos animais expostos ao DQ (Fig. 29).

O mesmo resultado foi observado no teste de ansiedade, ao avaliar o tempo de permanência dos animais nos quadrantes centrais (Fig. 30). Acreditamos que, provavelmente, o comprometimento da função locomotora dos animais, causado pelo DQ, causou a diminuição de entradas nos quadrantes centrais, gerando o perfil ansiogénico apresentado na figura 30.

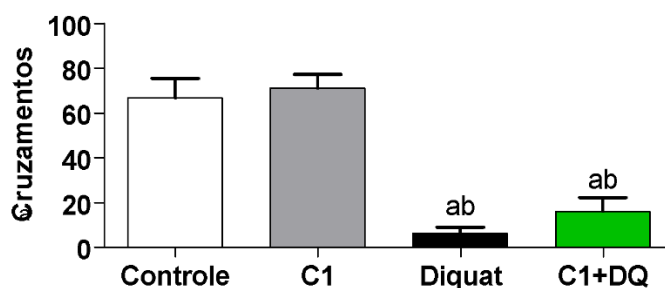


Figura 29. Capacidade locomotora. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Aplicação do teste comportamental 3h após a exposição ao diquat. O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a locomoção do animal pelos quadrantes da caixa. (a) Diferença significativa em relação ao grupo controle; (b) diferença significativa em relação ao grupo tratado

somente com o composto **1** (C1). Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

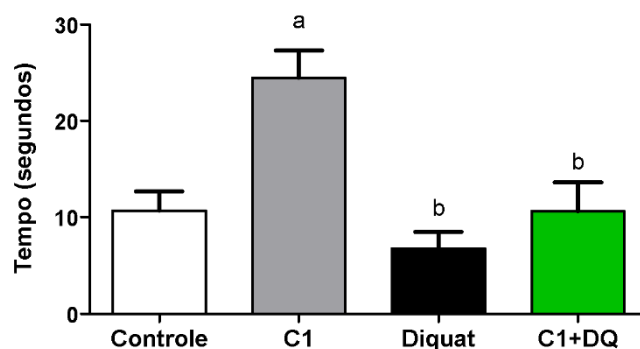


Figura 30. Comportamento ansioso. Ratos tratados com composto **1** (0,4 mg/Kg) ip., após 10 minutos, expostos ao diquat (0,1 mM/Kg) ip. Aplicação do teste comportamental 3h após a exposição ao diquat.. O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo ansioso do animal pelo tempo de permanência nos quadrantes centrais em relação ao tempo total de avaliação. (a) Diferença significativa em relação ao grupo controle; (b) diferença significativa em relação ao grupo tratado somente com o composto **1** (C1). Barras representam média \pm EPM (n=8). Significância estatística foi avaliada pelo teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Devido a redução da locomoção gerada pelo DQ os animais, expostos ao DQ e, os animais tratados com o composto **1** e expostos ao DQ, não realizaram a exploração dos objetos no teste de reconhecimento de objeto novo, inviabilizando a continuidade da aplicação do teste para esses grupos. Entre o grupo tratado somente com o composto **1** e o grupo controle não houve diferença estatística. Outros autores demonstraram ansiedade e déficit cognitivo em animais tratados com PQ, composto bupiridílico como o DQ (BALI et al., 2016; LI et al., 2016). Segundo os autores, esses sintomas aparecem antes que qualquer distúrbio motor se torne aparente. Com isso, o tempo de 3 horas após a exposição pode ter sido suficiente para que os efeitos motores se tornassem aparentes impedindo a avaliação dos danos cognitivos.

Curiosamente, observamos que o tratamento com o composto **1**, isoladamente, aumentou significativamente o número de entradas dos animais nos quadrantes centrais, demonstrando um possível efeito ansiolítico do composto **1** (Fig. 30). Os resultados comportamentais demonstram ainda, que o composto **1** apresenta esse efeito sem causar danos à memória ou alterações locomotoras. As análises bioquímicas e histológicas confirmam que o composto **1** isoladamente não acarreta danos ao hipocampo, tornando o composto **1** um promissor candidato no tratamento de transtornos de ansiedade.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a administração do composto **1** proporciona efeito neuroprotetor no desequilíbrio redox induzido por DQ em culturas celulares, evidenciada pela redução dos níveis intracelulares de EROs e da peroxidação lipídica. Os resultados *in vivo*, mostraram que, apesar do tratamento com composto **1** não impedir a redução da atividade da superóxido dismutase causada pelo diquat, ele reduz os níveis de peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas no hipocampo e córtex de ratos Wistar. Os achados *in vitro* e *in vivo* sugerem que a ação antioxidante do composto **1** ocorre de forma direta, reagindo com as EROs presentes nas células, e de forma indireta, ao propiciar o aumento da glutathione redutase.

As análises histomorfológicas e comportamentais sugerem ainda que, o tratamento com o composto **1**, reduz o número de neurônios lesionados (*dark neuros*) nas regiões CA1 e giro denteado, mesmo não sendo o suficiente para minimizar o perfil ansiogênico, muito provavelmente devido as alterações motoras causadas pela exposição ao diquat, que também não foram minimizadas com o tratamento. Os resultados também demonstram um possível efeito ansiolítico do composto **1**, tornando-o ainda mais promissor para distúrbios relacionados ao sistema nervoso central.

Mais estudos são necessários para avaliar e entender a farmacologia e a farmacocinética do composto **1** nos sistemas biológicos. Além disso, estudos buscando melhores formas de administração e apresentação do composto **1** seriam importantes para aumentar sua eficácia e reduzir efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit.**, 10(6):RA141-7, 2004. PMID: 15173684.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-6, 1984. Doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
- AHMAD, I. et al. Biochemical and molecular mechanisms of N -acetyl cysteine and silymarin- mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 201, n. 1-3, p. 9–18, 2013. Doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.027.
- AJAYI, I. E. Anatomy of the hippocampus and its emerging roles in modulating emotion-dependent autonomic activities. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, 124(3), 337-352, 2020. Doi.org/10.13128/ijae-11663.
- ASADBEGI, M. et al. Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet- fed rats. **Metab Brain Dis**, v. 32, p. 827–839, 2017. Doi:10.1007/s11011-017-9960-0.
- AYALA, B.T. et al. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2014; 360438, 2014b. Doi: 10.1155/2014/360438.
- BAEK, I.J. et al. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. **J Mol Histol.**, 38(3):237-44, 2007. Doi: 10.1007/s10735-007-9092-7.
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh J Pharmacol.**, v. 12, p. 115-118, 2017. Doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892
- BAILEY, K.R. and CRAWLEY, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd., 2009. ISBN 9781420052343.
- BALBINO, C.A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15163322005000100004&lng=en&nrm=iso>.
- BALDI, I. et al. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. **Am J Epidemiol.**, v. 157, n. 5, p. 409-14, 2003. Doi: 10.1093/aje/kwf216.
- BALI, Y. et al. Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 53–62, 2016. Doi: 10.1016/j.etap.2016.10.008.
- BARBOSA et al. 2010 <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- BARNHAM, K. J. et al. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 3, p. 205, 2004. ISSN 1474-1776. Doi:10.1038/nrd1330.

BARREIROS, A.L.B.S. and DAVID, J.P. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARRETO, J.E.F e SILVA, L.P. Sistema límbico e as emoções – uma revisão anatômica. *Rev. Neurocienc.*, 18(3):386-394, 2010. Doi: <https://doi.org/10.34024/rnc.2010.v18.8466>.

BEAR, M. **Neuroscience: Exploring the Brain, Enhanced Edition**. Jones & Bartlett Learning, LLC, 2020.

BEDARD K and KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews.**; 87: 245-313, 2007. Doi: 10.1152/physrev.00044.2005.

BELVINDRAH, R. et al. Neuronal migration and its disorders affecting the CA3 region. **Front Cell Neurosci.**, 8:63, 2014. Doi: 10.3389/fncel.2014.00063.

BENES, F.M. Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus. **Biological Psychiatry**, v.46, n. 5, p. 589–599, 1999. Doi: 10.1016/s0006-3223(99)00136-5.

BERG D. et al. Redox imbalance. **Cell Tissue Res.**, v. 318: 201–213, 2004. Doi: 10.1007/s00441-004-0976-5.

BERGHOLT, N.L. et al. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. **Cartilage**, v. 10, n. 3, p. 1–5, 2019. Doi: 10.1177/1947603518764262.

BEZERRA, F.J.L. et al. Thiobarbituric Acid Reactive Substances as an Index of Lipid Peroxidation in Sevoflurane-Treated Rats. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 54, n. 5, p. 640 – 649, 2004. Doi: 10.1590/s0034-70942004000500004.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J.**, v. 5, n.1, p. 9-19, 2012. Doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

BJØRLING-POULSEN, et al. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environ Health**, 7, 50, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-50>.

BONNEH-BARKAY, D. et al. Toxicity of Redox Cycling Pesticides in Primary Mesencephalic Cultures. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7, n. 5;6, 2005. Doi: 10.1089/ars.2005.7.649.

BRANDÃO, M.L et al. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 25, supl. 2, p. 36-4, 2003. Doi: 10.1590/S1516-44462003000600009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976. Doi: 10.1006/abio.1976.9999.

BROUILLET, E. et al. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. **J Neurochem.**, v. 95, p. 1521 – 1540, 2005. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x.

- CANNON, J.R. and GREENAMYRE, J.T. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. **Prog. Brain Res.**, 184, 17–33, 2010. Doi: 10.1016/S0079-6123(10)84002-6.
- CANTU, D. et al. Mitochondrial aconitase knockdown attenuates paraquat-induced dopaminergic cell death via decreased cellular metabolism and release of iron and H₂O₂. **J. Neurochem.**, 118, 79–92, 2011. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07290.x.
- CATANI, M. et al. A novel frontal pathway underlies verbal fluency in primary progressive aphasia. **Brain**, 136(Pt 8):2619-28, 2013. Doi: 10.1093/brain/awt163.
- CHELIKANI, P. et al. Diversity of structures and properties among catalases. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 192–208, 2004. Doi:10.1007/s00018-003-3206-5.
- CHEN, J. et al. Methylene blue attenuates acute liver injury induced by paraquat in rats. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 808–812, 2015. Doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.044.
- CHEN, Q. et al. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. **Neuro Toxicology**, v. 31 p. 310–316, 2010. Doi: 10.1016/j.neuro.2010.02.006.
- CHIRICO, M.T.T. **Influência da inflamação pulmonar sobre comportamento em ratos wistar expostos à fumaça de cigarro**. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2017.
- CLARK, D.E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of Intestinal Absorption. **J. Pharm. Sci.**, 88, 807–814, 1999.
- COHEME, H.M e MURPHY, M.P. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **J Biol Chem.**, v. 283, p. 1786–98, 2008. Doi: 10.1074/jbc.M708597200.
- COE, B.J et al., Unusually Facile Syntheses of Diquat (6,7-Dihydrodipyrido[1,2-a:2',1'-c]pyrazinediium) and Related Cations. **Synthesis**, (1): 146-150. Doi: 10.1055/s-2005-9217452006.
- COLLE, D. et al. Paraquat and Maneb Exposure Alters Rat Neural Stem Cell Proliferation by Inducing Oxidative Stress: New Insights on Pesticide-Induced Neurodevelopmental Toxicity. **Neurotoxicity Research.**, v. 34, p. 820–833, 2018. Doi:10.1007/s12640-018-9916-0.
- COMINSKI, T.P et al. The role of the hippocampus in avoidance learning and anxiety vulnerability. **Front Behav Neurosci.**, v. 2014, n.8, p. 273, 2014. Doi:10.3389/fnbeh.2014.00273.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim Acta**, v.329(1-2):23-38, 2003. Doi: 10.1016/s0009-8981(03)00003-2.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med.**, v.10(2):389-406, 2006. Doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x.

- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, 35(1):105-35, 2010. Doi: 10.1038/npp.2009.109.
- DAY, B.J. et al. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. **PNAS**, v. 96, n. 22, p. 12760-12765, 1999. Doi.org/10.1073/pnas.96.22.12760.
- DE NORONHA, S.R. et al. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 38-46, 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566182> >.
- DESCRIPTIONS, P. BODIPY Lipid Probes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 9, p. 3824–3827, 2003.
- DJUKIC, M. et al. Intrastratial pre-treatment with L-NAME protects rats from diquat neurotoxicity. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 4, 666-672, 2012.
- DORSEY, E. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, 17: 939-53, 2018.
- DRAPER, H.H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med.**, v. 15, n. 4, p. 353-63, 1993. Doi: 10.1016/0891-5849(93)90035-s.
- DRECHSEL, D.A and PATEL, M. Differential contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes to reactive oxygen species production by redox cycling agents implicated in parkinsonism. **Toxicol Sci.**, 112(2):427-34, 2009. Doi: 10.1093/toxsci/kfp223.
- DREVET, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 70-79, 2006. Doi: 10.1016/j.mce.2005.12.027.
- EICHENBAUM, H. Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 732-44, 2014. Doi: 10.1038/nrn3827.
- ERTL, P. et al. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **J. Med. Chem.**, 43, 3714–3717, 2000. Doi: 10.1021/jm000942e.
- FARRUGIA, G and BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in oncology**, v. 2, n. 64, 2012. Doi: 10.3389/fonc.2012.00064.
- FEDERICO, A. et al. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 322, p. 254–262, 2012. Doi: 10.1016/j.jns.2012.05.030.
- FLOHÉ, B.R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radic Biol Med.**, v. 27, n. 9-10, p. 951- 65, 1999. Doi: 10.1016/s0891-5849(99)00173.
- FORMAN, H.J. et al. An overview of mechanisms of redox signaling. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 73, p. 2-9, 2014. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.

- FRANCO, R. et al. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease. **Chem Biol Interact.**, v. 188, n.2, p. 289– 300, 2010. Doi: 10.1016/j.cbi.2010.06.003.
- FRITZ, K.S and PETERSEN, D.R. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. **Free Radic Biol Med.**, v. 59, p. 85–91, 2013. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025.
- GAWARAMMANA, I.B and BUCKLEY, N.A. Medical management of paraquat ingestion. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 72, n. 5, p. 745–757, 2010. Doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04026.x.
- GBD. Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [**published correction appears in Lancet.**, 12;393(10167):132, 2019] [published correction appears in *Lancet.*, 22;393(10190):e44, 2019]. *Lancet.*, 018;392(10159):1923-1994, 2017.
- GENC, G.E. et al. Selenoproteins are involved in antioxidant defense systems in thalassemia. **Metallomics.**, v. 9, 2017. Doi. 10.1039/D0MT00142B.
- GIACINTO, B. et al. Involvement of a Glutamatergic Mechanism in δ -Dendrotoxin-Induced Hippocampal Neuronal Cell Loss in the Rat. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 94 (3), 132–138, 2004. Doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto940306.x.
- GOYAL, M.M and BASAK, A. Hydroxyl radical generation theory: a possible explanation of unexplained actions of mammalian catalase. **Int J Biochem Mol Biol.**, 3(3):282-9, 2012. PMID: PMC3476794.
- HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934. Doi: 10.1037/h0071444.
- HALLIWELL B and GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, 5 ed., 2015. ISBN 9780198717478.
- HAN, J. et al. Natural Antioxidant Betanin Protects Rats from Paraquat-Induced Acute Lung Injury Interstitial Pneumonia. Hindawi Publishing Corporation. **BioMed Research International**, v. 2015, 9 pages, 2015. Doi:10.1155/2015/608174.
- HANAGASI, H.A. et al. Mitochondrial complex I, II/III, and IV activities in familial and sporadic Parkinson's disease. **Int J Neurosci.**, v. 115, p. 479–493, 2005. Doi:10.1080/00207450590523017.
- HERMUND, D.B. **Antioxidant properties of seaweed-derived substances.** In *Bioactive Seaweeds for Food Application - Natural Ingredients for Healthy Diets.* Academic Press, v. 2018. p. 201-221, 2018. ISBN: 978-0-12-813312-5.
- HERNÁNDEZ, A.F. et al. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. **Toxicology**, 307; 95–102, 2013. Doi: 10.1016/j.tox.2012.09.007.

- HIGUCHI, M. et al. Effect of diquat-induced oxidative stress on iron metabolism in male Fischer-344 rats. **Biometals**, 24:1123–1131, 2011. Doi: 10.1007/s10534-011-9470.
- HIGUCHI, M. et al. Wheat bran protects Fischer-344 rats from diquat-induced oxidative stress by activating antioxidant system: selenium as an antioxidant. **Biosci Biotechnol Biochem.**, 75:496–499, 2011b. Doi: 10.1271/bbb.100719.
- HITTI, F.L and SIEGELBAUM, S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, 3;508(7494):88-92, 2014. Doi: 10.1038/nature13028.
- HOMER, R.F et al. Mode of action of dipyrindyl quaternary salts as herbicides. **J Sci Food Agric.**, 11: 309, 1960. Doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740110604>.
- HOUZEL, H.S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. **Frontiers in human neuroscience**, v. 3, n. 31, 2009. Doi: 10.3389/neuro.09.031.2009.
- IBRAHIM, F.W. et al. Neuroprotective Effects of Ethyl Acetate Extract of Zingiber zerumbet (L.) Smith against Oxidative Stress on Paraquat-Induced Parkinsonism in Rats. **Sains Malaysiana**, v. 47, n. 10, p. 2337–2347, 2018. Doi:10.17576/jsm-2018-4710-10.
- IGHODARO, O.M. and AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, p. 287–293, 2018. Doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- INVITROGEN. **Glutathione Colorimetric Detection Kit**. Catalog Number EIAGSHC. Termo fisher. available in thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FEIAGSHC_GSH_color_detection_PI.pdf.
- JENNER, P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.87, Issue S146, 1993. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1993.tb00013.x>.
- JIN, J and MAREN, S. Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. **Front Syst Neurosci.**, 15;9:170, 2015. Doi: 10.3389/fnsys.2015.00170.
- JORTNER, B.S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. **Neurotoxicology**, v. 27, p. 628–634, 2006. Doi: 10.1016/j.neuro.2006.03.002.
- JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Guanabara Koogan, 12 ed, 558 pages. Rio de Janeiro. ISBN 978 -85-277-23 11-4, 2013.
- K. OHL. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. **Experimental Neurology**, v. 277, Pages 58-67. 2016. Doi: 10.1016/j.expneurol.2015.11.010.
- KANDEL, E.R, et al. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, 27;157(1):163-86, 2014. Doi: 10.1016/j.cell.2014.03.001.

- KARNA, P. et al. Induction of reactive oxygen species-mediated autophagy by a novel microtubule-modulating agent. **J Biol Chem.**, v. 285, p. 18737–18748, 2010. Doi: 10.1074/jbc.M109.091694.
- KARUPPAGOUNDER, S.S. et al. Investigate the Chronic Neurotoxic Effects of Diquat. **Neurochem Res.**, 37:1102–1111, 2012. Doi: 10.1007/s11064-012-0715-3.
- KASPAR, J.W. et al. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Rad Biol Med.**, v. 47, p. 1304–1309, 2009. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035.
- KEHRER, J.P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, Issue 1, Pages 43-50, 2000. Doi: 10.1016/S0300-483X(00)00231-6.
- KESNER, R.P. et al. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. **Reviews in the Neurosciences**, v. 15, n. 5, p. 333–351, 2004. Doi: 10.1515/revneuro.2004.15.5.333.
- KESNER, R.P. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. **Learning and Memory**, v. 14, n. 11, p. 771–781, 2007. Doi:10.1101/lm.688207.
- KIM, J.J and DIAMOND, D.M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci.**, v.3(6):453-62, 2002. Doi: 10.1038/nrn849.
- KRISHNAMURTHY, P. and WADHWANI, A. Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. **InTech**, v. 3rd., 2012. Doi:10.5772/48109.
- KRISHNAN, P.R. Restless legs syndrome in Parkinson's disease: a case-controlled study. **Mov Disord.**, 18(2):181-5, 2003. Doi: 10.1002/mds.10307.
- KUHN, H. and BORCHERT, A. Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 154–172, 2002. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)00855-9.
- KULBACKA, J. et al. Apoptosis, Free Radicals and Antioxidant Defense in Antitumor Therapy. **Intech**, p. 265–302, 2012. Doi: 10.5772/50357
- KURUME, A. et al. Synthesis of 3-substituted isocoumarins and their inhibitory effects on degranulation of RBL-2H3 cells induced by antigen. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 56, p. 1264–1269, 2008. Doi: 10.1248/cpb.56.1264.
- KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutr J.**, 25;15(1):71, 2016. Doi: 10.1186/s12937-016-0186-5.
- LEE, K.M. et al. Pesticide metabolite and oxidative stress in male farmers exposed to pesticide. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, 29:5, 2017. Doi: 10.1186/s40557-017-0162-3.
- LEÓN, A. et al. Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity in A.D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi (eds.), Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. **Springer International Publishing**, v. 104, 2017. Doi: 10.1007/978-3-319-45618-8_2.

- LEVINE, R.L., et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, 233:346-57, 1994. Doi: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9.
- LEZAK, K.R. et al. Behavioral methods to study anxiety in rodents Métodos conductuales para estudiar la ansiedad en roedores Méthodes comportementales d'étude de l'anxiété chez les rongeurs. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v.19, Issue 2, 2017. Doi: 10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon.
- LI, B. et al. Developmental exposure to paraquat and maneb can impair cognition, learning and memory in Sprague-Dawley rats. **Mol. BioSyst.**, v. 12, 3088, 2016. Doi: 10.1039/c6mb00284f.
- LI, X. et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J Hematol Oncol.**, v. 6, p. 19, 2013. Doi: 10.1186/1756-8722-6-19.
- LIU, G.Y and STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res.**, 44(5):479-96. 2010. Doi: 10.3109/10715761003667554.
- LIPINSKI, C.A, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev.**, 46(1-3):3-26, 2001. Doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- LIPINSKI, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discov Today Technol.**,1(4):337-41, 2004. Doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
- LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev.** v. 4(8):118-26, 2010. Doi: 10.4103/0973-7847.70902.
- LOGRADO, L.P.L. et al. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3480–3489, 2010. Doi: 10.1016/j.ejmech.2010.05.015.
- LÜ, J.M., et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010. Doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- LU, T. et al. Protective effects of Forsythia suspensa extract against oxidative stress induced by diquat in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 764–770, 2010. Doi:10.1016/j.fct.2009.12.018.
- LUSHCHAK, V.I. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. **Biochemistry Moscow**, 72, 809–827, 2007. Doi: 10.1134/S0006297907080020.
- MA, F. et al. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. **J Thromb Thrombolysis**, v. 33, p. 64–73, 2012. Doi: 10.1007/s11239-011-0647-9.
- MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. Editora Atheneu, 3 ed., São Paulo. 340 páginas. ISBN 978-85-388-0457-4, 2014.

- MAGALHÃES, N. et al. Human and experimental toxicology of diquat poisoning: Toxicokinetics, mechanisms of toxicity, clinical features, and treatment. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37(11) 1131–1160, 2018. Doi: 10.1177/0960327118765330.
- MAGNANI, F and MATTEVI, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, 59:91–97, 2019. Doi: 10.1016/j.sbi.2019.03.001.
- MAILLOUX, R.J. et al. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. **Trends Biochem Sci**, v. 38, n.12, p. 592–602, 2013. Doi: 10.1016/j.tibs.2013.09.001.
- MARKLUND, S. and MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 474, p. 469–474, 1974.
- MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, v.16, 577–586, 2005. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- MATTHEWS, K.A. et al. Racial and ethnic estimates of Alzheimer’s disease and related dementias in the United States (2015–2060) in adults aged ≥ 65 years. **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, 15: 17-24, 2019.
- MCCOLLUM, M., et al. Post-MPTP treatment with granulocyte colony-stimulating factor improves nigrostriatal function in the mouse model of parkinson’s disease. **Molecular Neurobiology**, v. 41, p. 410-419, 2010. Doi:10.1007/s12035-010-8118-4.
- MCCORMACK, A.L. et al. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **J Neurochem.**, v.93, p.1030–1037, 2005. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03088.x.
- MCCORMACK, A.L. et al. Environmental Risk Factors and Parkinson’s Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. **Neurobiology of Disease**, v.10, p.119–127, 2002. Doi: 10.1006/nbdi.2002.0507.
- MEHMANDOST, N. et al. Heracleum Persicum based biosorbent for the removal of paraquat and diquat from Waters. **Journal of Environmental Chemical Engineering.**, 8;104481, 2020. Doi: 10.1016/j.jece.2020.104481.
- MELO, J.O.F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006. Doi: 10.1590/S0100-40422006000300028.
- MISHRA, A. et al. Isobenzofuranone derivatives exhibit antileishmanial effect by inhibiting type II DNA topoisomerase and inducing host response. **Pharmacology research & perspectives**, v. 2, n. 6, e00070, 2014. Doi: 10.1002/prp2.70.
- MONTINE, T. et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer’s Disease. **Free Radic Biol Med.**, v. 33, n. 5, p. 620-6, 2002. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)00807-9.

- MOLNAR, A. et al. Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques. **Amino Acids**, vol. 53, pages 917–928, 2021. Doi: 10.1007/s00726-021-02994-w.
- MORÓN, Ú. M.; CASTILLA-CORTÁZAR, I. Protection Against Oxidative Stress and “IGFI Deficiency Conditions”. **Antioxidant Enzyme**, 2012. Doi: 10.5772/51047.
- MÜLLER, M. et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 76, 444, 2012. Doi: 10.1128/MMBR.05024-11.
- NAKASHIBA, T. et al. Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. **Science**, v. 319, p. 1260–1264, 2008. Doi: 10.1126/science.1151120.
- NASPOLINI, N.F. **Efeito neuroprotetor do extrato butanólico de ilex paraguariensis na toxicidade induzida por paraquat em hipocampo de ratos pré-púberes**. 122 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2016.
- NEVID, J.F. Essentials of Psychology: Concepts and Applications. **Cengage Learning**, v. 5, 688 pages, 2016. ISBN:978305964174.
- NIEDZIELSKA, E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol.**, v. 53, p. 4094–4125, 2016. Doi:10.1007/s12035-015-9337-5.
- NIKOLOVA, G. Oxidative stress and Parkinson disease. **Trakia Journal of Sciences**, v. 10, n. 1, p. 92-100, 2012. ISSN 1313-7050. Available online at: <http://www.uni-sz.bg>.
- NITATORI, T. et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 1001–1011, 1995. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-02-01001.1995.
- NIU, J. et al. Cerium oxide nanoparticles inhibits oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, p.53–61, 2011. Doi:10.1124/jpet.111.179978.
- NOGUEIRA, K.D.O.P.C. et al. Phagocytosis of spermatozoa by epithelial cells in the vagina of the lizard *Hemidactylus mabouia* (Reptilia, Squamata). **Micron.**, v. 42, n. 5, p. 377–380, 2011. Doi: 10.1016/j.micron.2010.10.008.
- OAK, M.H. et al. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **J Nutr Biochem.**, 16(1):1-8. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2004.09.004. PMID: 15629234.
- OHTSUKA, A and MURAKAMI, T. Dark neurons in the mouse brain: an investigation into the possible significance of their variable appearance within a day and their relation to negatively charged cell coats. **Arch Histol Cytol.**, 1996 Mar;59(1):79-85, 1996. Doi: 10.1679/aohc.59.79.
- PANCHATCHARAM, M. et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Mol Cell Biochem.**, v. 290, p. 87–96, 2006. Doi: 10.1007/s11010-006-9170-2.

- PARAN, E. et al. The effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 2, p. 145-151, 2019. Doi:10.1007/s10557-008-6155-2.
- PEGORETTI, V. et al. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2020, 19 pages, 2020. Doi: 10.1155/2020/7191080.
- PENELL, J. et al. Persistent organic pollutants are related to the change in circulating lipid levels during a 5 year follow-up. **Environ Res.**, 134:190-7. Doi: 10.1016/j.envres.2014.08.005.
- PERCÁRIO, S. et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2360872, 23p., 2020. Doi: 10.1155/2020/2360872.
- PISA, L.W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 22, pp. 68-102, 2015.
- PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2017:8416763, 2017. Doi: 10.1155/2017/8416763.
- PIZZUTTI, I.R. et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, 209; 248–255, 2016. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.069.
- PLAITAKIS, A. and SHASHIDHARAN, P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurol.**, 247 Suppl 2: II25-35, 2000. Doi: 10.1007/pl00007757.
- POIRIER, J.L. et al. Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**, 97(1):59-68, 2000. Doi: 10.1016/s0306-4522(00)00026-9.
- POSSAMAI, F.P et al. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. **Environ Toxicol Pharmacol.**, 23:198–204, 2007. Doi: 10.1016/j.etap.2006.09.003.
- PROUDFOOT, R. Drugs, leads, and drug-likeness: An analysis of some recently launched drugs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 12, 1647–1650, 2012. Doi: 10.1016/s0960-894x(02)00244-5.
- PRUCHNIAK, M.P. et al. Biochemistry of Oxidative Stress. **Adv Exp Med Biol.**, 878:9-19, 2016. Doi: 10.1007/5584_2015_161.
- PURVES, D. et al. **Neuroscience**. Oxford University Press, 6 ed., Oxford, 2017. ISBN: 9781605353807. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>.
- RAJNEESH, et al. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **bio-protocol.**, 7. 1-8, 2017. Doi: 10.21769/BioProtoc.2545.

- RANJBAR, A. et al. Role of Cerium Oxide Nanoparticles in a Paraquat-Induced Model of Oxidative Stress: Emergence of Neuroprotective Results in the Brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 66, p. 420–427, 2018. Doi: 10.1007/s12031-018-1191-2.
- RAO, P.S. et al. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free Radical and Antioxidant*, v.1, n. 4, p. 2-7, 2011. Doi: 10.5530/ax.2011.4.2.
- REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 7, 1, p. 1302-1319, 2011. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027.
- REZNICK, A.Z. and PACKER, L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in Enzymology*, 233, 357-363, 1994. Doi: 10.1016/S0076-6879(94)33041-7.
- RIBEIRO, I.M.L. et al. Neuroprotective Effect of Isobenzofuranones on Hydrogen Peroxide-Mediated Redox Imbalance in Primary Cultures of Hippocampal Neurons. *Braz. arch. biol. technol.*, Curitiba, v. 63, e20190072, 2020. Doi:10.1590/1678-4324-2020190072.
- ROCHA, G. Stress oxidativo na lesão pulmonar neonatal. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v. 14, n. 1, p. 113–126, 2008. DOI: 10.1016/S0873-2159(15)30221-X.
- SÁNCHEZ, N.F.S. et al. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Intechopen*, v. 22, 2019. Doi: 10.5772/intechopen.85270.
- SANTOS, U.P. et al. Poluição do ar ambiental: efeitos respiratórios. *J Bras Pneumol.*, 47(1): e20200267, 2021. Doi: <https://dx.doi.org/10.36416/1806-3756/e20200267>.
- SARDOIWALA, M.N. et al. Chapter 37 - Development of Engineered Nanoparticles Expediting Diagnostic and Therapeutic Applications Across Blood–Brain Barrier. Chaudhery Mustansar Hussain, In *Micro and Nano Technologies, Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*. Elsevier, v. 2018, p. 696-709, 2018. Doi:10.1016/B978-0-12-813351-4.00038-9.
- SAYRE, L.M. et al. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med Chem.*, v. 8, n. 7, p. 721-38, 2001. Doi: 10.2174/0929867013372922.
- SEET, R.C.S. et al. Oxidative damage in Parkinson Disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 48, p. 560-566., 2010. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026.
- SERRA, D. et al. Chapter One - Polyphenols in the management of brain disorders: Modulation of the microbiota-gut-brain axis. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 91, p. 1-27, 2020. Doi. 10.1016/bs.afnr.2019.08.001.
- SHAHIDI, F and AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, vol. 18, Part B, Pages 820-897, 2015. Doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018.
- SHAHIDI, F and NACZK, M. Phenolics in Food and N; utraceuticals. *Food Science & Technology, Physical Sciences*, 2nd Edition, 576 pages, 2003. Doi: 10.1201/9780203508732.

SHAW, C.A and BAINS, J.S. Synergistic versus antagonistic actions of glutamate and glutathione: the role of excitotoxicity and oxidative stress in neuronal disease. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, 48(2):127-36, 2002. PMID: 11990449.

SHETTY, K and WAHLQVIST, M.L. A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pac J Clin Nutr.**, 13(1):1-24, 2004. PMID: 15003910.

SHIH, P.H. et al. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. **J Agric Food Chem.**, v.55, p. 9427–35, 2007. Doi: 10.1021/jf071933i.

SHYAMLAL, B.R.K. et al. Synthesis, Bioevaluation, Structure-Activity Relationship and Docking Studies of Natural Product Inspired (Z)-3-benzylideneisobenzofuran-1(3H)-ones as Highly Potent antioxidants and Antiplatelet agents. **Sci Rep.**, v. 10, 2307, 2020. Doi:10.1038/s41598-020-59218-6.

SI, C.L. et al. Antioxidant properties and neuroprotective effects of isocampneoside II on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 145–152, 2013. Doi:10.1016/j.fct.2013.05.051.

SILVA, B.F.R.I. Intoxicação por diquat. **Acta Toxicol.**, 25 (2): 39-46, 2017.

SINGH, B. et al. Liquid Crystalline Properties of 3-[4-(4'-Alkoxybenzoyloxybenzylidene) amino]-1,2,4-triazines: Synthesis and Characterization. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, 517:1, 127-137, 2010. Doi: 10.1080/15421400903483957.

SINGH, A. et al. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, 24, 1583, 2019. Doi: 10.3390/molecules24081583.

SINGH, M. et al. Neuroprotective mechanisms of the standardized extract of *Bacopa monniera* in a paraquat/diquat-mediated acute toxicity. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 530–539, 2013. Doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.030.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Arch Toxicol.**, 87, 1157–1180, 2013. Doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4.

SMITH, C.V. et al. Oxidant stress and hepatic necrosis in rats treated with diquat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.235, 172– 177, 1985. PMID: 3930698.

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. **Brain facts**. Washington DC, 2018. from <http://www.brainfacts.org/The-Brain-Facts-Book>.

SOLOMONS, T.W.G and FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2, 7ed., Editora LTC, v. 1, 648 p.; v. 2, 644 p, 2000.

SOTLER, R. et al. A. PROOXIDANT ACTIVITIES OF ANTIOXIDANTS AND THEIR IMPACT ON HEALTH. **Acta Clin Croat.**, 58(4):726-736, 2019 Dec;. Doi: 10.20471/acc.2019.58.04.20.

- STARKOV, A.A. et al. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. **Cell Calcium.**, 36(3-4):257-64, 2004. Doi: 10.1016/j.ceca.2004.02.012.
- SULTANA, R. et al. A peroxidação lipídica desencadeia a neurodegeneração: uma visão proteômica redox no cérebro da doença de Alzheimer. **Radic livre Biol Med.**, v. 62, p. 157-169, 2013. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.027.
- TAMBUNAN, U.S.F. et al. In silico modification of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) as potential inhibitor for class II histone deacetylase (HDAC). **BMC Bioinformatics**, 12, S13–S23, 2011.
- TEIXEIRA, A.R. et al. Association of electroanalytical and spectrophotometric methods to evaluate the antioxidant activity of isobenzofuranone in primary cultures of hippocampal neurons. **Toxicology in Vitro**, v. 68, 104970, 2020. Doi:10.1016/j.tiv.2020.104970.
- TEIXEIRA, R. et al. Synthesis and Antiproliferative Activity of C-3 Functionalized Isobenzofuran-1(3H)-ones. **Molecules**. v.18, n.2, p.1881-1896, 2013. Doi. 10.3390/molecules18021881.
- THIRUCHELVAM, M. et al. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. **Eur. J. Neurosci.**, v.18, p.589-600, 2003. Doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02781.x.
- TIAN, X. et al. Preclinical Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Plasma Protein Binding of Sodium (\pm)-5-Bromo-2-(α -Hydroxypentyl) Benzoate (BZP), an Innovative Potent Anti-ischemic Stroke Agent. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 7, art. 255, 2016. Doi:10.3389/fphar.2016.00255.
- TSIEN, J. Z. et al. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, v. 87, p. 1327–1338, 1996. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81827-9.
- TURKEZ, H. et al. Protective effects of cyclosativene on H₂O₂-induced injury in cultured rat primary cerebral cortex cells. **Cytotechnology**, v. 67, n. 2, p. 299–309, 2015. Doi: 10.1007/s10616-013-9685-9.
- URSINI, F. et al. Diversity of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology (USA)**, v. 252, 1995. Doi: 10.1016/0076-6879(95)52007-4.
- UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**. Mar;7(1):65-74, 2009. Doi: 10.2174/157015909787602823.
- VALVERDE, M.I. et al. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latino americanos de Nutrición.**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000. ISSN 0004-0622.
- VAN STRIEN, N.M. et al. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nat Rev Neurosci.**, 10(4):272-82, 2009. Doi: 10.1038/nrn2614.

VASILEV, D. S. et al. Transient Morphological Alterations in the Hippocampus After Pentylentetrazole-Induced Seizures in Rats. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 8, p. 1671–1682, 2018. Doi: 10.1007/s11064-018-2583-y.

VENDITTI, P. et al. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p.71–82, 2013. Doi: 10.1016/j.mito.2013.01.008.

WALKER, D.L. and DAVIS, M. Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. **Brain Struct Funct.**, 213, 29–42, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0183-3>.

WANG, F., et al. Mechanical stretch exacerbates the cell death in SH-SY5Y cells exposed to paraquat: mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neuro Toxicology**, v. 41, p. 54–63, 2014. Doi: 10.1016/j.neuro.2014.01.002.

YUAN, S.B. et al. Effects of oxidative stress on growth performance, nutrient digestibilities and activities of antioxidative enzymes of weanling pigs. **Asian Austral. J. Anim.**, 20, 1600–1605, 2007.

WATSON, C AND PAXINOS, G. **The Rat Brain. In stereotaxic coordinates**. Division of Health Sciences Curtin University of Technology Perth, Australia. 2004.

WELCH, K.D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic Biol Med.**, 32(7): 577-83, 2002. Doi: 10.1016/s0891-5849(02)00760-8.

XU, D.P. et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 96, 2017. Doi:10.3390/ijms18010096.

YAN, Q. et al. Cocatalytic Fenton Reaction for Pollutant Control. **Cell Reports Physical Science**, v. 1, Issue 8, 100149, 2020. Doi: 10.1016/j.xcrp.2020.100149.

YANG, et al. Gender Differences: A Lifetime Analysis of the Economic Burden of Alzheimer's Disease. **Women's Health Issues**, 25: 436-40, 2020.

YAO, L.H. et al. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. **Plant Foods Hum Nutr.**, 59, 113–122, 2004. Doi: 10.1007/s11130-004-0049-7.

YOUSEF, M.I., et al. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. **Food Chem. Toxicol.** 46, 1176–1183, 2009. Doi:10.1016/j.fct.2009.02.007.

ZAIA, D.A.M. et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. Doi.10.1590/S0100-40421998000600020.

ZHANG, Q. et al. Cytotoxicity of lambda-cyhalothrin on the macrophage cell line RAW 264.7. **J Environ Sci.**, v. 22, p. 428–432, 2010. Doi: 10.1016/S1001-0742(09)60125-X.

ZHANG, Q. et al. Evidence for DNA-diquat interaction and cytotoxicity in in vitro rat cells. **Environ Chem Lett.**, v.10, p.35–39, 2012. Doi: 10.1007/s10311-011-0325-3.

ZÁRATE-ROMERO, A. et al. X-ray driven reduction of Cpd I of Catalase-3 from *N. crassa* reveals differential sensitivity of active sites and formation of ferrous state.

Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 666, Pages 107-115. ISSN 0003-9861, 2019. Doi: 10.1016/j.abb.2019.03.020.

ZIMMERMANN, K.A. **Nervous System: Facts, Function and Diseases**. Live Science, New York. 2018. Available from <https://www.livescience.com>.

ZOROV, D.B. et al. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev.**, 94(3):909-50, 2014. Doi: 10.1152/physrev.00026.2013.

Article - *Biological and Applied Sciences*

Neuroprotective Effect of Isobenzofuranones on Hydrogen Peroxide-Mediated Redox Imbalance in Primary Cultures of Hippocampal Neurons

Iára Mariana Léllis Ribeiro¹
<https://orcid.org/0000-0003-4711-8172>

Laser Antônio Machado Oliveira¹
<https://orcid.org/0000-0002-9918-932X>

Wagner Luiz Pereira³
<https://orcid.org/0000-0001-9515-3832>

Róbson Ricardo Teixeira³
<https://orcid.org/0000-0003-3181-1108>

Leonardo Brandão Nogueira²
<https://orcid.org/0000-0001-5108-2315>

Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira^{1*}
<https://orcid.org/0000-0001-5495-2558>

¹Federal University of Ouro Preto, Department of Biological Sciences, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; ²Federal University of Ouro Preto, Department of Geology, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; ³Federal University of Viçosa, Department of Chemistry, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Received: 2019.02.07; Accepted: 2019.11.26.

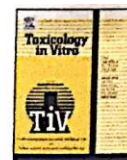
*Correspondence: katiane@ufop.edu.br; Tel.: +55-31-35591215

HIGHLIGHTS

- Primary neuronal cultures as a model on studies of cytotoxicity.
- Isobenzofuranones described neuroprotective activity.
- Isobenzofuranones control reactive oxygen species in cultured neurons.

Abstract: In live organisms, there is a balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and their neutralization. The increased level of these species leads to a condition called redox imbalance. The aim of this study was to evaluate the protective action of isobenzofuranones in primary cultures of hippocampal neurons subjected to redox imbalance. To accomplish this, MTT and LIVE/DEAD assays were initially performed. In the cultures pretreated with isobenzofuranones 1 and 2, there was a higher number of live cells when compared to that in the untreated ones. Regarding redox imbalance, there was a significant increase in the intracellular levels of ROS. The cultures pretreated with isobenzofuranones showed a reduction in ROS levels. Lipid peroxidation caused by oxidative damage was significantly reduced in the cultures pretreated with isobenzofuranones 1 and 2. Taken together, these data show the ability of isobenzofuranones 1 and 2 to significantly minimize cytotoxicity, cell death, intracellular levels of ROS and lipid peroxidation induced by redox imbalance. These results suggest that isobenzofuranones 1 and 2 represent a possible alternative therapy for the neurodegenerative disturbances that are triggered by ROS production increases.

Keywords: reactive oxygen species, isobenzofuranones, phthalide, hippocampal neurons, redox imbalance.



Association of electroanalytical and spectrophotometric methods to evaluate the antioxidant activity of isobenzofuranone in primary cultures of hippocampal neurons



Aniely dos Reis Teixeira^a, Róbson Ricardo Teixeira^b, Iara Mariana Lellis Ribeiro^a, Wagner Luiz Pereira^b, Taise Matte Manhabosco^c, Ana Carolina Ferreira de Brito^c, Laser Antônio Machado Oliveira^a, Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira^{a,*}

^a Neurobiology and Biomaterials Laboratory, Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

^c Department of Physics - REDEMAT, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Spectrophotometric methods
Cyclic voltammetry
Isobenzofuranones
Hippocampal neurons
Free radicals
Antioxidants

ABSTRACT

The isobenzofuran-1(3H)-ones (phtalides) exhibit various biological activities, including antioxidant activity on reactive oxygen species (ROS). An excess of ROS that cannot be naturally contained by cellular enzymatic systems is called redox imbalance, which damage cell membranes, proteins, and DNA, thereby possibly triggering neuronal death in several neurodegenerative diseases. Considering our ongoing efforts to find useful compounds to control redox imbalance, herein we evaluated the antioxidant activity of two phtalides (compounds 3 and 4), using primary cultures of hippocampal neurons. Spectrophotometric assays showed that compound 3 significantly reduced ($p \leq 0.05$) ROS levels and lipid peroxidation compared to the control treatment, while compound 4 was unable at any of the tested concentrations. Despite their structural similarity, these compounds behave differently in the intracellular environment, which was reliably corroborated by the determination of oxidation potentials via cyclic voltammetry. It was demonstrated that compound 3 presents a lower oxidation potential. The combination of the mentioned methods allowed us to find a strong correlation between the chemical structure of compounds and their biological effects. Taking together, the results indicate that compound 3 presents desirable characteristics to act as a candidate pharmacological agent for use in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases.

1. Introduction

Primary cell cultures, specifically those of hippocampal neurons, obtained from a region associated with higher cognitive functions, such as learning and memory, are quite relevant for studies regarding pathogenic mechanisms involved in neurodegenerative diseases. Unlike cell lines of the nervous system, in primary cultures, hippocampal neurons become polarized, with developed axons and dendrites, facilitating the formation of functional synaptic connections (Benson et al., 1994; Kaeck & Banker, 2006). The development of physiological characteristics similar to those observed *in vivo* results in these cultures being widely used for studies in the field of neurobiology, including as a model for studying the neurotoxicity of free radicals as well as the interaction between reactive oxygen species (ROS) and protective effects

of compounds with antioxidant properties (Catlin et al., 2016; Gordon et al., 2013). Neurotoxicity triggered by redox imbalance is a common feature in the development of different types of neurodegenerative diseases. Therefore, compounds that can act as preventive treatments have extensively been tested primarily using spectrophotometric techniques (Kim et al., 2017; Leal et al., 2012; Pisoschi & Pop, 2015).

Development of new drugs that are capable of curbing redox imbalance and the consequent damage to cell membranes, proteins, and DNA, without causing neuronal toxicity, remains a challenge in the field of neurobiology. Considering this context, organic synthesis has emerged as an alternative that allows structural modifications in compounds that can perform well in both *in vitro* and *in vivo* assays. For instance, in isobenzofuran-1(3H)-ones (phtalides) the introduction of functional groups at specific molecular sites lead to antiplatelet,

* Corresponding author at: Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, s/n, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, CEP: 35400-000.

E-mail address: katiane@ufop.edu.br (K.d.O.P. Coelho Nogueira).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104970>

Received 25 May 2020; Received in revised form 30 July 2020; Accepted 12 August 2020

Available online 14 August 2020

0887-2333/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO II – Depósito do pedido de patente



06/06/2018 870180048230
15:35



0000221704596208

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 011460 3

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Aplicação de isobenzofuran-1(3H)-onas no tratamento de doenças neurodegenerativas associados ao desequilíbrio redox

Resumo: No estado fisiológico do organismo, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. Quando esse equilíbrio é perdido é gerada uma condição conhecida como desequilíbrio redox. Essa condição está ligada à patogênese de várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (DA). Por isso, os organismos desenvolveram defesas contra as propriedades tóxicas do oxigênio. Uma primeira linha de defesa é proporcionada por um sistema de enzimas antioxidantes e substâncias antioxidantes não enzimáticas. Existem também os antioxidantes exógenos, que podem ser compostos naturais ou sintéticos. As isobenzofuran-1(3H)-onas fazem parte de uma classe de compostos químicos de natureza heterocíclica com atividade antioxidante. Com isso, esse estudo teve o propósito de avaliar a atividade protetora de isobenzofuran-1(3H)-onas sintéticas em culturas primárias de neurônios hipocampais submetidos ao estresse oxidativo. Os resultados obtidos demonstraram um bom desempenho das isobenzofuran-1(3H)-onas como antioxidantes e sugere que os compostos podem representar um componente adicional na terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas, que são impulsionados pelo aumento da produção de ERO's.

Figura a publicar: IS

