

## EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTOCIANINAS EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER

BRUNA DA SILVEIRA DE MATTOS<sup>1</sup>; SIMONE MUNIZ PACHECO<sup>2</sup>; MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>3</sup>; MARIANA GERZSON<sup>4</sup>; PATHISE SOUTO OLIVEIRA<sup>5</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – bruna.mtt@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – simonemunizpacheco@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – mayara\_sandrielly@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - mgerzson@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - pathisesouto@hotmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas - rspanevello@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A demência decorrente da doença de Alzheimer (DA) envolve alterações nos aspectos cognitivo, funcional e comportamental do indivíduo, sendo o seu diagnóstico basicamente clínico. A principal característica neuropatológica da DA é a presença de placas senis compostas por peptídeo  $\beta$ -amiloide e emaranhados neurofibrilares derivados da agregação de microtúbulos associados à proteína tau (IQBAL et al., 2014).

Nenhum tratamento disponível hoje atua nos eventos moleculares centrais da DA. Estudos na literatura tem abordado o potencial terapêutico dos nutracêuticos em patologias do sistema nervoso central. O uso de antioxidantes naturais pode atuar como forma alternativa, uma vez que o estresse oxidativo parece possuir um papel importante na fisiopatologia da doença (QIN et al., 2013). Dentre estes compostos naturais, as antocianinas apresentam uma potente atividade antioxidante, o que pode contribuir para a sua atividade neuroprotetora, modulando a progressão da DA (BADSHAH et al., 2015).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor de um extrato rico em antocianinas sobre a perda de memória e sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Animais

Utilizou-se 40 ratos machos *Wistar*, com 60 dias de idade (250-300g), obtidos do Biotério Central da UFPel. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C}\pm 1$ ), ciclo de 12 horas claro/escuro, água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 0179).

#### 2.2 Modelo de Demência Esporádica do Tipo Alzheimer

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10): I - Controle, II - Antocianinas, III – Estreptozotocina (STZ), IV - Antocianinas + STZ. Após, realizou-se procedimento cirúrgico para a indução da demência do tipo Alzheimer através de injeção intracerebroventricular (ICV) de STZ. Os animais dos grupos III e IV receberam STZ ICV (3 mg/Kg) diluído em tampão citrato (pH 4,5) e os animais dos grupos I e II receberam volume equivalente do tampão (TIWARY et al., 2009).

### 2.3 Tratamento com Antocianinas

Após três dias da cirurgia, iniciou-se o tratamento com extrato rico em antocianinas extraídas e purificadas da casca da uva e fornecidas pela empresa *Christian Hansen A/S*. As antocianinas foram administradas aos grupos II e IV na concentração de 200 mg/Kg de acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (GUTIERRES et al., 2014) e a solução salina aos grupos I e III. Tanto as antocianinas quanto a solução salina foram administradas por via oral com o auxílio de uma sonda de gavagem durante 25 dias.

### 2.4 Caracterização Comportamental dos Animais

No vigésimo quarto dia, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Vinte e quatro horas após o teste do campo aberto foi realizado o teste de reconhecimento de objetos. Após 12 h, os animais foram submetidos à eutanásia, e o córtex cerebral foi coletado para posteriores análises bioquímicas.

### 2.5 Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo

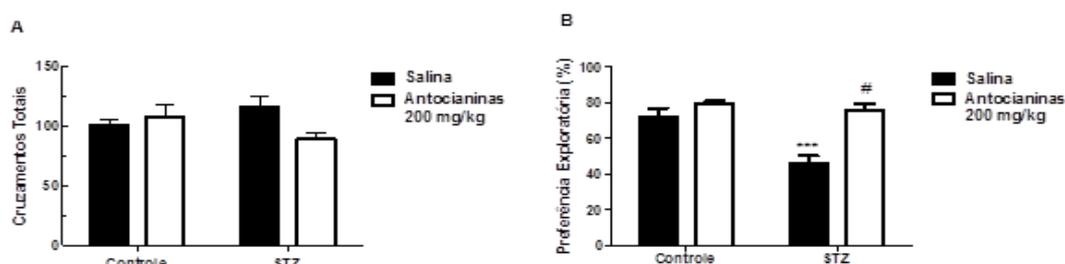
O córtex cerebral foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM, contendo 140 mM de KCl (pH 7,4), e centrifugado, para obtenção do sobrenadante o qual foi utilizado para a determinação dos seguintes parâmetros de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990); conteúdo tiólico total de acordo com Aksenov e Markesbery (2001); atividade da catalase (CAT) segundo método de Aebi (1984); atividade da superóxido dismutase (SOD) de acordo com Misra e Fridovich (1972); atividade da glutathiona peroxidase (GPx) avaliada através de kit comercial Randox.

### 2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni, considerando diferença significativa quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

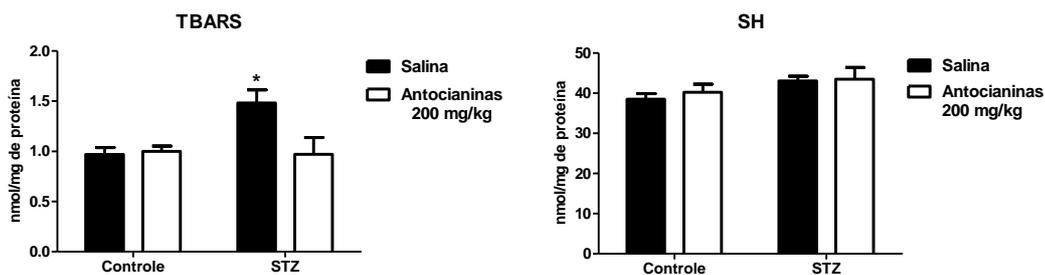
Nesse estudo, não foram observadas diferenças significativas no teste do campo aberto, indicando que nem as antocianinas nem o STZ alteram a capacidade locomotora dos animais (Figura 1A). Em relação ao teste de reconhecimento de objetos, observou-se que o grupo que recebeu apenas STZ ICV apresentou menor tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar.



**Figura 1:** Efeito da administração das antocianinas em animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer em parâmetros comportamentais. (A) Número de cruzamentos totais no teste de campo aberto. (B) Preferência exploratória no teste de reconhecimento de objetos. \*\*\* $P < 0,001$  comparado ao grupo controle. # $P < 0,001$  quando comparado ao grupo STZ.

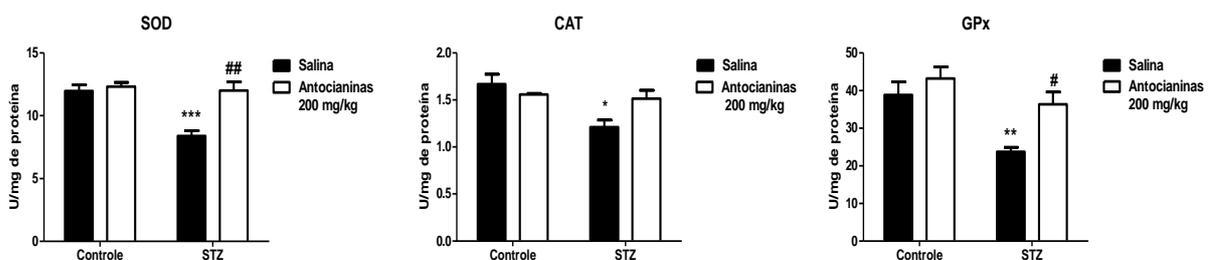
Esse achado demonstra que o STZ ICV foi capaz de induzir déficit de memória de curto prazo nos animais. Por outro lado, o tratamento com antocianinas atenuou essa disfunção mnemônica provocada pelo STZ (Figura 1B).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, observou-se um aumento significativo dos níveis de TBARS no grupo que recebeu apenas o STZ, indicando peroxidação lipídica (Figura 2). A administração das antocianinas foi capaz de reduzir o dano no grupo STZ + ANT. Não se constatou efeito *per se* das antocianinas. Em relação ao conteúdo tiólico total, não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 2).



**Figura 2:** Efeito do tratamento com antocianinas em animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer em parâmetros de estresse oxidativo. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Encontrou-se também uma diminuição significativa da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx no grupo que recebeu STZ. As antocianinas foram capazes de atenuar a redução da atividade das enzimas antioxidantes no grupo STZ + ANT. Novamente, não foi observado efeito *per se* das antocianinas (Figura 3).



**Figura 3:** Efeito do tratamento com antocianinas em animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer sobre a atividade de enzimas antioxidantes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle. #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo STZ.

Sabe-se que o tecido cerebral apresenta alta vulnerabilidade ao dano oxidativo, uma vez que o mesmo utiliza grande quantidade de oxigênio como fonte energética e possui baixos níveis de enzimas antioxidantes, especialmente durante o envelhecimento. Além disso, apresenta membranas celulares ricas em ácidos graxos poli-insaturados que são muito vulneráveis às espécies reativas de oxigênio, levando à perda da sua integridade com conseqüente disfunção e morte neuronal (MANSOURI et al., 2013). Assim, as antocianinas, em virtude de sua alta capacidade antioxidante, são compostos promissores na neuroproteção (MIGUEL, 2011).

#### 4. CONCLUSÕES

Esses resultados indicam que a injeção ICV de STZ foi capaz de alterar a memória de curto prazo dos animais e de promover dano oxidativo no córtex cerebral. Além disso, o tratamento com extrato rico em antocianinas atenuou o déficit de memória e o estresse oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, n.1 p.121-126, 1984.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v.302, n.2-3, p.141-145, 2001.
- BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. O. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. **Neurochemistry International**, v.80, p.51-59, 2015.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v.186, n.1, p.407-421, 1990.
- GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M. A.; SCHMATZ, R.; SILVA, C. R.; COGNATO, G. P.; FARIAS, J. G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; BOGO, M.; BONAN, C. D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Sciences**, v. 1-2, p. 7-17, 2014.
- IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C. Alzheimer disease therapeutics: Focus on the disease and not just plaques and tangles. **Biochemical Pharmacology**, v.88, n.4, 631-639, 2014.
- MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; BAVARSAD, K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 111, p.90-96, 2013.
- MIGUEL, M. G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.6, p.7-15, 2011.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.
- TIWARI, V.; KUHAD, A.; BISHNOI, M.; CHOPRA, K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, n.2, p.183-189, 2009.