

EFEITO PROTETOR DE 6-((4-FLUORFENIL)SELANIL)-PURINA EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS: ENVOLVIMENTO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.

KARLINE C. RODRIGUES¹; MIKAELA P. PINZ²; LUIS FERNANDO B. DUARTE³; DIEGO ALVES⁴, ETHEL A. WILHELM⁵, CRISTIANE LUCHESE⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – line.karline@hotmail.com* ²*Universidade Federal de Pelotas – mikaelappinz@gmail.com*, ³*Universidade Federal de Pelotas – luis.duarte@ufpel.edu.br* ⁴*Universidade Federal de Pelotas – dsalves@gmail.com*

⁵ *Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (coorientadora)*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora)*

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada como uma desordem neurodegenerativa que envolve vários mecanismos bioquímicos e moleculares, além de apresentar disfunção sináptica, déficit cognitivo, estresse oxidativo e neuroinflamação (O'BRIEN E WONG, 2011; SERRANO-POZO et al., 2011). Durante o desenvolvimento da DA, presume-se que a perda da memória se encontra associada, principalmente, ao decréscimo da função colinérgica (BARTUS RT, 2000). Essa condição é acompanhada por declínio da acetilcolina (VINUTHA et al., 2007) devido a um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina presente no sistema nervoso central (SNC) (MARTINI, et al., 2015).

O modelo de indução da DA pela estreptozotocina (STZ), uma nitrosamina de ocorrência natural, é utilizado para estudar esta patologia (SHARMA et al., 2010). Sabe-se que a administração da STZ causa danos no controle do metabolismo cerebral de glicose, levando a um aumento de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo, o que contribui para neurodegeneração, levando a vários distúrbios comportamentais, como por exemplo de déficit cognitivo (DUELLI R. et al., 1994).

A DA é uma desordem que não tem cura e o tratamento é apenas sintomático, melhorando aspectos cognitivos e funcionais. Neste contexto, torna-se importante o desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença (ALVES, et al., 2012). Neste sentido, compostos contendo selênio, os quais desempenham atividade neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (PINTON., 2011; PINZ, et al., 2016), associados as bases de purinas, as quais são importantes moduladores da atividade sináptica no SNC e interagem com o sistema colinérgico (SCHMIDT, et al., 2007), podem ser uma promissora alternativa terapêutica para a DA.

Com base no que foi exposto, o presente trabalho teve o intuito de avaliar o possível efeito neuroprotetor do composto 6-((4-fluorfenil)selanil)-purina (LF174B) em um modelo de DA induzida por STZ em camundongos, bem como o envolvimento da atividade da enzima AChE neste efeito.

2. METODOLOGIA

O LF174B (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da Universidade Federal de Pelotas (LASOL).

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº CEEA 7046/2016).

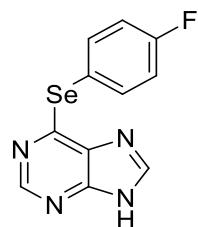


Figura 1. Estrutura química de 6-((4-fluorofenil)selanil)-purina (LF174B)

Foram utilizados camundongos machos adultos Swiss (20-25g), os quais foram divididos em quatro grupos experimentais (6 animais por grupo). Do 1º ao 10º dia do protocolo experimental, os camundongos dos grupos controle e STZ receberam óleo de canola (10mg/kg), enquanto que os animais dos grupos LF174B e STZ+LF174B receberam o composto (1 mg/kg) por via per oral (p.o.). Trinta minutos após estes tratamentos, no 1º e 3º dias do protocolo experimental, os animais dos grupos STZ e STZ+LF174B receberam por via intracerebroventricular (i.c.v.) a STZ (2 μ l/ 2,5 mg/ml), enquanto os animais controle e LF174B receberam solução salina 0,9% (2 μ l) (PINTON et al., 2011).

Para avaliar a memória não espacial de longo prazo, no 10º e 11º dias os animais foram submetidos a tarefa da esquiva inibitória conforme SAKAGUCHI et. al. (2006). Primeiramente foi realizado um treino, que consistiu em avaliar o tempo que o animal leva para descer da plataforma com as 4 patas na grade. Neste momento, o animal recebeu um choque elétrico (0,5 mA) até retornar à plataforma e permanecer por 1 minuto, indicando o aprendizado do animal na tarefa. O teste foi realizado 24 horas após o treino de forma semelhante, na qual foi cronometrado o tempo de descida da plataforma para a grade.

Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia, e as estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) foram removidas para dosagem da atividade da enzima AChE. Estas estruturas foram homogeneizados em tampão Médium I em uma proporção de 1:10 e foram centrifugadas a 3000 rotações por minutos durante 10 minutos. Posteriormente, 100 μ L do sobrenadante foi utilizado para análise, que foi determinada colorimetricamente a 412 nanômetros, de acordo com o método descrito por ELLMAN (1961).

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado mostrado na figura 2-A demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos no dia do treino na tarefa da esquiva inibitória. Na figura 2-B, a STZ reduziu o tempo de descida da plataforma, indicando que a STZ causou um prejuízo de memória nos camundongos. A administração de

LF174B (1 mg/kg) prolongou o tempo de descida da plataforma. Estes resultados indicam que o composto previne contra o prejuízo na memória não espacial de longo prazo induzido por STZ.

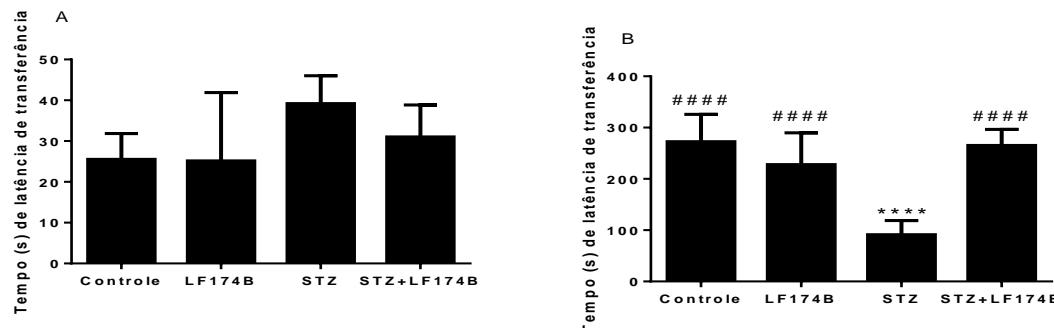


Figura 2. Avaliação da resposta protetora de (4-fluorfenil)selanil-purina (LF174B) no (A) treino e (B) teste da esquiva inibitória. (****) indicam $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle; e (#####) indicam $p < 0,0001$, quando comparado com o grupo estreptozotocina (STZ). (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

As figuras 3-A e 3-B apresentam o efeito de LF174B na atividade da AChE, no córtex cerebral e hipocampo dos camundongos, respectivamente. A STZ aumentou a atividade da AChE em ambas estruturas cerebrais. A administração de LF174B (1 mg/kg) protegeu contra o aumento na atividade da enzima. Estes resultados sugerem que o composto foi capaz de modular a disfunção na neurotransmissão colinérgica induzida pela STZ.

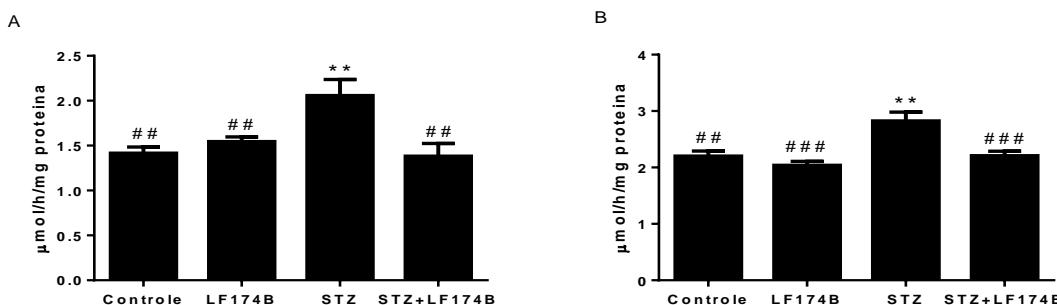


Figura 3. Avaliação de (4-fluorfenil)selanil-purina (LF174B) na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no (A) córtex e (B) hipocampo. (**) indicam $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle; (##) indicam $p < 0,01$ e (###) indica $p < 0,001$, quando comparado com o grupo estreptozotocina (STZ). (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls)

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que o composto LF174B, foi capaz de prevenir contra o prejuízo de memória em um modelo de DA induzido por STZ em camundongos. Além disso, a atividade da AChE está envolvida no efeito protetor do composto. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade deste composto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.; CORREIA, A.S.A.; MIGUEL, R.; ALEGRIA, P.; BUGALHO, P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. **Frontiers in Neurology**; v.3, p.1-20, 2012.
- BARTUS RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology**; v.163, n. 2, p. 495– 529, 2000.
- DUELLI R., SCHRÖCK H., KUSCHINSKY W., HOYER S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. **International Journal of Dev Neuroscience**; v. 12, p.737–743, 1994
- ELLMAN, G. L; COURTNEY, K. D.; ANDRES, Jr. V.; FEATHERSTONE, M.R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, California, v.7, n.1, p.88-95, 1961.
- MARTINI, F.; BRUNING, C. A.; SOARES, S. M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Inhibitory Effect of Ebselen on Cerebral Acetylcholinesterase Activity In Vitro: Kinetics and Reversibility of Inhibition. **Current Pharmaceutical Design**, USA, v.21, n.7, p. 920-924, 2015.
- O'BRIEN R.J.; WONG P.C.; Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. **Annual Review of Neuroscience**; v.34, p.185–204; 2011.
- PINTON S., ROCHA J.T., GAI B.M., PRIGOL M., ROSA L.V., NOGUEIRA C.W. Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism. **Cell Biochemistry and Function**; v.29, p.235–243; 2011.
- PINZ, M.; REIS, A.S.; DUARTE, V.; DA ROCHA, M.; GOLDANI, B.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM E. A. **European Journal of Pharmacology**, v.780, p.122-128, 2016.
- SAKAGUCHI, M.; KOSEKI, M.; WAKAMATSU, M.; MATSUMURA, E. Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.530, p. 81-87; 2006.
- SCHMIDT AP, LARA DR, SOUZA DO: Proposal of a guaninebased purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology and Therapeutics** v.116, p.401-416, 2007
- SERRANO-POZO A.; FROSCH M.P.; MASLIAH E.; HYMAN B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 1:a006189; 2011.
- SHARMA, N.R. DESHMUKH, K.L. BEDI, A competitive inhibitor of JNK attenuates streptozotocin induced neurocognitive deficit and oxidative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**., v.96, p. 386-394, 2010.
- VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.359-63, 2007.