

## AVALIAÇÃO NEUROPROTETORA DAS ANTOCIANINAS EM UM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER: EFEITOS SOBRE A MEMÓRIA E A ATIVIDADE DA $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

**JULIANA MOURA<sup>1</sup>; JESSIÉ GUTIERRES<sup>2</sup>, FABIANO CARVALHO<sup>3</sup>, MARIA ROSA SCHETINGER<sup>4</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – juliananmmoura@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – jessiegutierres@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil – fabieco@yahoo.com.br*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil – mariascheting@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – rspanevello@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

As antocianinas pertencem à família dos flavonóides, que apresentam grupos fenólicos em sua estrutura química e estão presentes em uma grande variedade de flores e frutos. As antocianinas possuem potentes ações antioxidantes com propriedades scavengers de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Além disso, tem sido demonstrado que estas moléculas possuem efeitos benéficos na memória e cognição e são capazes de modular a atividade de enzimas do sistema nervoso central (KAHKONEN, 2003; SHIB et al., 2010; GUTIERRES et al., 2014).

A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é uma enzima ligada à membrana sendo essencial para a manutenção do equilíbrio iônico dos neurônios por regular a entrada de  $\text{K}^+$  e a saída de  $\text{Na}^+$  das células (ARNAIZ & ORDIERES, 2014). Alterações na atividade desta enzima podem afetar diretamente a transmissão sináptica, a plasticidade neuronal e o processo de aprendizado e memória (PETRUSHANKO et al., 2016).

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em idosos sendo caracterizada por um progressivo e irreversível declínio em várias funções intelectuais. As principais características neuropatológicas incluem deposição extracelular de placas formadas pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide e o acúmulo intracelular de emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína tau hiperfosforilada. Além disso, dados da literatura tem demonstrado que outros fatores também estão associados à patogênese da DA como o estresse oxidativo, a neuroinflamação, disfunção da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e anormalidades do metabolismo da glicose (ARNAIZ & ORDIERES, 2014). A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em ratos vem sendo utilizada para induzir demência esporádica do tipo Alzheimer, uma vez que esta condição experimental mimetiza muitos processos patológicos presentes nesta doença como disfunções no metabolismo da glicose e energia cerebral e déficits progressivos em aprendizagem e memória (HOYER, 2004; AWASTHI et al., 2010).

Considerando que DA é a patologia neurodegenerativa mais prevalente em todo o mundo e que as antocianinas possuem propriedades antioxidantes, neuroprotetoras e ansiolíticas, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o pré tratamento com estes compostos naturais tem a capacidade de prevenir déficits de memória e alterações na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 *Animais*

Foram utilizados 40 ratos wistar machos adultos (350-400 g) os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Durante todo o período de tratamento os animais foram mantidos em condições experimentais controladas e tiveram livre acesso a dieta padrão e água.

### 2.2 *Tratamento com antocianinas e injeção intracerebroventricular de STZ*

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: I - controle, II - antocianinas (ANT), III - estreptozotocina (STZ) e IV - antocianinas + estreptozotocina (ANT +STZ). Os animais dos grupos II e IV foram primeiramente tratados com antocianinas (200 mg/kg) por via oral durante sete dias, enquanto os animais dos grupos I e III receberam o volume equivalente de solução salina. No último dia de tratamento com antocianinas ou salina, os animais foram anestesiados e o crânio foi perfurado em ambos os lados de acordo com as coordenadas estereotáxicas para os ventrículos laterais. Os animais dos grupos III e IV receberam injeção intracerebroventricular bilateral de STZ (3 mg/Kg) diluído em tampão citrato (pH 4,5), colocando-se o volume de 5  $\mu$ L em cada ventrículo através de uma seringa de 28-gauge Hamilton® de 10  $\mu$ L anexada ao aparato estereotáxico. Os animais dos grupos I e II receberam pelo mesmo procedimento o volume equivalente de tampão citrato.

### 2.3 *Testes comportamentais*

Os testes comportamentais iniciaram cinco dias após a injeção de STZ ou tampão citrato nos animais. Primeiramente foi realizado o teste do campo aberto o qual consiste em avaliar a atividade locomotora dos animais. O aparato do campo aberto consistiu em uma caixa com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados em um período de 5 minutos foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Este teste foi realizado para identificar deficiências motoras, o que poderia influenciar no desempenho do teste de esquiva inibitória.

O teste de esquiva inibitória avalia memória e aprendizado através da aplicação de choques elétricos. No treino os animais foram colocados em um aparelho que consistiu em uma caixa de 25 x 25 x 35 cm com um piso de grade cuja porção esquerda estava coberta por uma plataforma de 7 x 25 cm, 2,5 cm de altura. O rato foi colocado na plataforma e quando o animal desceu com as quatro patas na grade, um choque de 0,5 mA de 3 segundos foi aplicado na grade. Vinte e quatro horas após a sessão de treino o animal foi novamente colocado na plataforma e o tempo que o mesmo levou para descer a grade foi registrado e comparado com o tempo de sessão de treino. Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia e o córtex cerebral e hipocampo foram removidos para a análises bioquímicas.

### 2.4 *Determinação da atividade da enzima $Na^+, K^+$ -ATPase*

A atividade de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foi avaliada em córtex cerebral e hipocampo como descrito por WYSE et al. (2000) e CARVALHO et al. (2012). A atividade específica de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foi calculada subtraindo a atividade insensível à ouabaína da atividade geral (na ausência de ouabaína) e os resultados foram expressos em nmol de Pi/min/mg de proteína.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que não houve alterações na tarefa do campo aberto em relação ao número de cruzamentos totais e o número de rearings (levantamentos em duas patas) em nenhum dos grupos analisados. No teste da esquiva inibitória foi observado que a injeção de STZ (3mg/kg) causou uma diminuição da memória dos animais quando comparado ao grupo controle ( $P<0.05$ ), sendo que tratamento com antocianinas por sete dias foi capaz de prevenir esta alteração.

Em relação a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foi observado uma redução na atividade desta enzima tanto em hipocampo quanto em córtex cerebral em animais submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (grupo III) quando comparado ao grupo controle (grupo I) ( $P<0.05$ ). O tratamento com antocianinas (200 mg/kg) por sete dias foi capaz de prevenir esta alteração em ambas as estuturas cerebrais nos animais do grupo IV.

Dados da literatura tem demonstrado que uma diminuição da atividade e expressão da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode afetar diretamente a sinalização de neurotransmissores prejudicando a aprendizagem e a memória, bem como os comportamentos de ansiedade em ratos (DOS REIS et al., 2002). Desta forma, pode-se sugerir que a diminuição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase observada neste estudo em córtex cerebral e hipocampo pode estar associada com déficits de memória nos animais submetidos a um modelo de experimental da DA. Além disso, cabe destacar que enzima é sensível a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio cujos níveis cerebrais encontram-se elevados neste modelo experimental (TIWARI et al., 2009). Assim, a atividade antioxidante das antocianinas poderia modular a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e este poderia ser um mecanismo associado com a melhora da memória nos animais tratados com estes compostos naturais.

### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com antocianinas foi capaz de melhorar a memória de animais submetidos a um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer. Um dos mecanismos envolvidos neste efeito benéfico pode estar associado ao potencial que estes compostos naturais têm de modular a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo, duas regiões cerebrais importantes nos processos de memória e aprendizagem.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWASTHI, H.; TOTA, S.; HANIF, K.; NATH, C.; SHUKLA, R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life Science** v. 86, p.87-94, 2010.

CARVALHO, F.B.; MELLO, C.F.; MARISCO, P.C.; TONELLO, R.; GIRARDI, B.A.; FERREIRA, J.; OLIVEIRA, M.; RUBIM, M. Spermidine decreases Na(+), K(+)-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **European Journal of Pharmacology** v. 684: 79-86, 2012.

DOS REIS, E. A.; DE OLIVEIRA, L. S.; LAMERS, M. L.; NETTO, C. A.; WYSE, A. T. Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Research** v. 951; p. 151-157.

GUTIERRES, J.M.; CARVALHO, F.B.; SCHETINGER, M.R.; AGOSTINHO, P.; MARISCO, P.C.; VIEIRA, J.M.; ROSA, M.M.; BOHNERT, C.; RUBIN, M.A.; MORSCH, V.M.; SPANEVELLO, R.; MAZZANTI, C.M. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience** v.33, p. 88-97, 2014.

HOYER, S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v.541, p.135-152, 2004.

KAHKONEN, M. P.; Heinonen, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.51, p. 628-633, 2003.

SHIH, P. H.; CHAN, Y. C.; LIAO, J. W.; WANG, M. F.; YEN, G. C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry** v.21, p.598-605, 2010.

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: 183-189, 2009.

WYSE, A.T.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M. Methylmalonate administration decreases Na+, K+-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **Neuroreport** v.11, p.2331-2334, 2000.