

QTC-4-MeOBnA atenua o déficit cognitivo e alterações neuroquímicas em modelo animal de Alzheimer

MARIA CLARA MARTINS FERREIRA¹; MARIANA FRONZA¹; RODOLFO BALDINOTTI¹; BRUNA GOLDANI²; KARINE BEGNINI³; DIEGO ALVES²; LUCIELLI SAVEGNAGO¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia – maria.c.martins07@gmail.com; luciellisavegnago@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa

³Universidade Federal de Pelotas, Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por ser uma patologia neurodegenerativa que afeta progressivamente a memória e a cognição. Segundo o World Alzheimer Report (2015), cerca de 46,8 milhões vivem com a doença. Dentre as características histopatológicas mais relevantes estão: as placas senis compostas de peptídeo β -amilóide (A β) e os emaranhados neurofibrilares formados a partir da proteína TAU hiperfosforilada (KUMAR et al., 2015).

Além disso, a geração excessiva de espécies reativas pode levar a danos a biomoléculas. Dessa forma, o estresse oxidativo pode contribuir para a disfunção mitocondrial e ativar a enzima glicogênio sintase kinase 3 β (GSK3- β), uma das principais kinases responsáveis pela hiperfosforilação da TAU. Recentemente foi demonstrado que a atividade elevada da GSK3 β está relacionada ao aumento dos níveis de A β e danos sinápticos em pacientes com DA e em modelos animais (SIMIC et al., 2016).

Nesse sentido, através de ferramentas bioinformáticas de triagem e docagem molecular, o composto 1-(7-cloroquinolin-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA) foi escolhido pelo nosso grupo de pesquisa devido sua capacidade de modulação com a enzima GSK3- β .

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do QTC-4-MeOBnA frente ao déficit de memória induzido por estreptozotocina (STZ) através da modulação do estresse oxidativo e expressão gênica da GSK3- β em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (35g-50g) acondicionados à temperatura de 22 ± 25°C, em ciclo claro/escuro (12/12h) e comida e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com 5-8 animais por grupo e os ensaios protocolados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº 4344-2015).

2.2 Drogas

O composto QTC-4-MeOBnA (Fig. 1) foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica Limpa da UFPel. O mesmo foi dissolvido em óleo de canola e administrado pela via intragástrica (i.g.) nos animais em um volume constante de 10 mL/Kg. A estreptozotocina (STZ) foi adquirida da Sigma-Aldrich e dissolvida em salina e administrada pela via intracerebroventricular (icv) em uma dose de 3 mg/Kg.

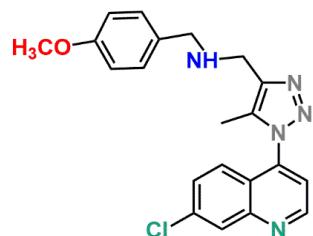


Figura 1. Estrutura química do 1-(7-cloroquinolin-4-il)-N-(4-metoxibenzil)-5-metil-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxamida (QTC-4-MeOBnA).

2.3 Administração via ICV

Foi realizada a partir do método de “mão livre” previamente descrito (HALEY e MCCORMICK, 1957), utilizando uma microseringa (25 µL, Hamilton) com uma taxa limite de 3 µL/sítio e o bregma como ponto de referência.

2.4 Protocolo experimental

Os camundongos foram tratados com QTC-4-MeOBnA ou óleo de canola (pela via i.g.) por 20 dias consecutivos. Nos dias 21 e 23, os animais receberam injeções de STZ (3mg/Kg) pela via icv e de salina. Após a segunda injeção pela via icv, foi realizado o teste comportamental do labirinto Y e no dia 46, os camundongos foram eutanasiados e o cérebro foi dissecado para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

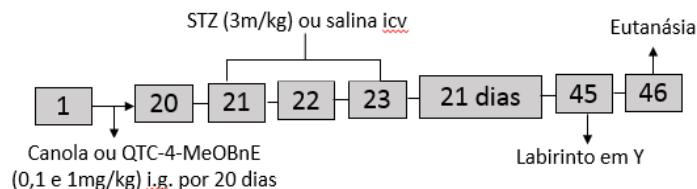


Figura 2. Design experimental

2.5 Labirinto em Y

O teste do Labirinto em Y, utilizado para a avaliação da memória espacial de curto prazo, foi realizado de acordo com SARTER et al. (1988). O aparato consiste em um labirinto com três braços, onde cada braço corresponde a uma letra (A, B ou C). Neste teste, o animal é posto em um dos braços e avalia-se o comportamento de alternância entre os braços e o número de entrada nos mesmos. A alternância é definida como a entrada nos braços com as quatro patas de forma consecutiva sem repetição das letras. Os resultados foram expressos em % de alternância = [(Número de alternância x 3)/ Entradas totais nos braços -2)] x 100.

2.6 Quantificação das espécies reativas

A quantificação das espécies reativas foi realizada de acordo com LOETCHUTINAT et al. (2005). Nesse ensaio, a oxidação da 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCHF-DA) à forma fluorescente diclorofluorescina (DCF) é mensurada para detecção de espécies reativas intracelulares no espectrofluorímetro (emissão de 520 nm e excitação de 480 nm).

2.7 Expressão gênica por qRT-PCR

O mRNA total foi extraído de córtex pré-frontal e hipocampo usando TRIzol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) seguido do tratamento por DNase com DNA-free® kit (Ambion™, USA). A síntese de cDNA foi realizada usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™, UK). A amplificação foi feita utilizando UltraSYBR Mix (COWIN Bioscience Co., Pequim, China) e os primers da

enzima GSK3- β foram sintetizados pela Exxtend (Brasil). A expressão gênica foi normalizada utilizando o gene β -actina.

2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos média \pm erro padrão de média (EPM) por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls, através do software GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi possível observar que a administração de STZ (3mg/Kg) induziu déficit de memória (Fig. 3) em animais submetidos ao teste do labirinto em Y. Nesse sentido, o QTC-4-MeOBnA foi eficaz na proteção ao declínio de memória em ambas as doses testadas (0,1 e 1mg/Kg).

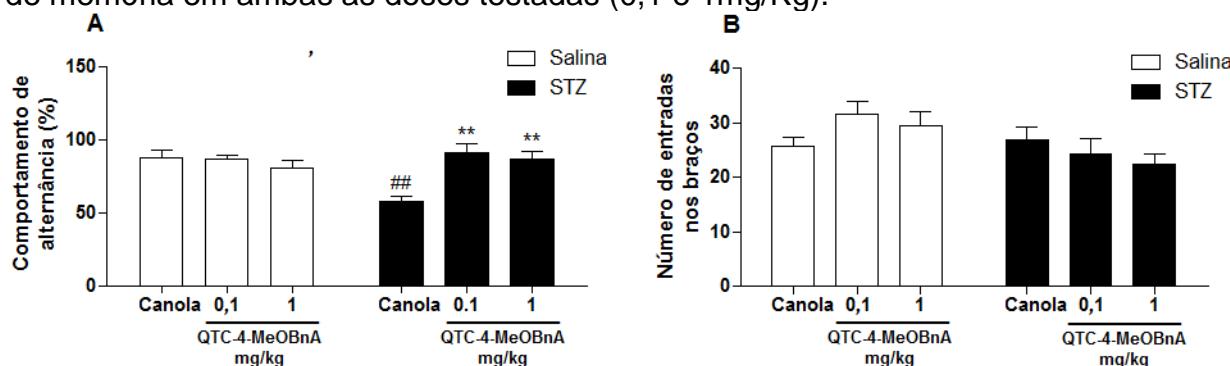


Figura 3. Efeito do pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA no comportamento de alternância (A) e número de entradas (B) no labirinto em Y em camundongos submetidos a injeção de STZ (3mg/Kg) ou salina. Resultados são expressos como média \pm EPM, onde (##) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle e (**) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo/STZ. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls).

Além disso, a injeção de STZ foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas (Fig. 4) e os níveis de expressão de GSK3- β (Fig. 5) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos quando comparado ao grupo controle. Este resultado pode ser explicado devido ao fato que o estresse oxidativo pode levar à ativação da GSK3- β .

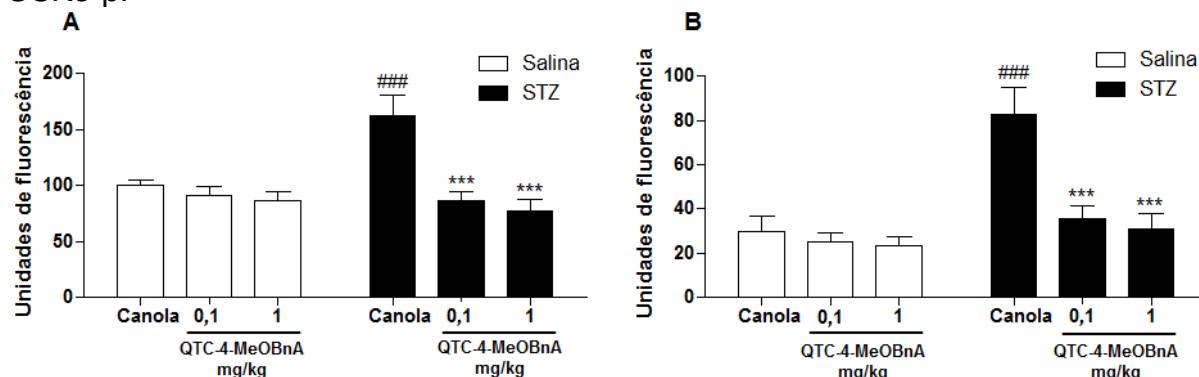


Figura 4. Efeito do pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA nos níveis de espécies reativas no córtex pré-frontal (A) e no hipocampo (B) em camundongos submetidos a injeção de STZ (3mg/Kg) ou salina. Resultados são expressos como média \pm EPM, onde (###) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle e (*** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo veículo/STZ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls).

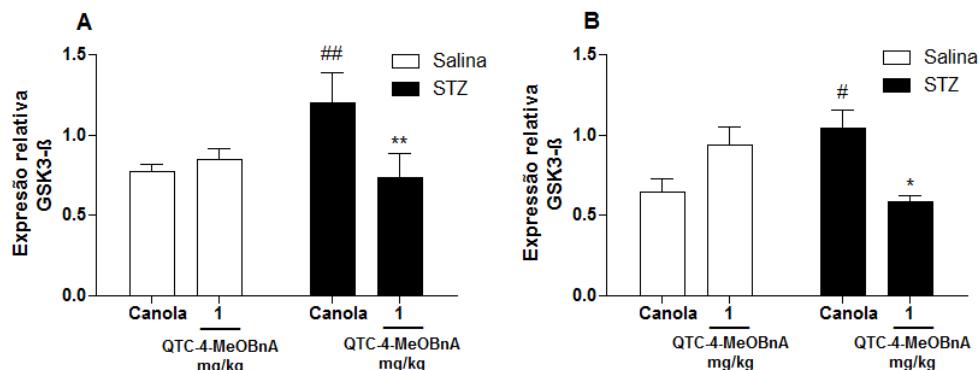


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com QTC-4-MeOBnA nos níveis de GSK3- β no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) em camundongos. Resultados são expressos como média \pm EPM, onde (#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo/STZ. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de post-hoc de Newman-Keuls).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o composto protegeu frente ao declínio de memória, estresse oxidativo e modulação da expressão da GSK3- β . Entretanto, mais estudos são necessários para a elucidação do seu potencial biológico na terapia da doença de Alzheimer.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HALEY, T.J., MCCORMICK, W.G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 12, p. 12-15, 1957.
- KUMAR, A.; EKAVALI, A.S. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 195-203, 2015.
- LLORENS-MARTÍN, M.; JURADO, J.; HERNÁNDEZ, F.; ÁVALIA, J. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. **Front Mol Neurosci.**, v. 7, p. 1-11, 2014.
- LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAYGERIN, J.; MANKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 72, p. 323-331, 2005.
- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, p. 491-495, 1988.
- SIMIC, G., BABIC LEKO, M., WRAY, S., HARRINGTON, C., DELALLE, I., JOVANOV-MILOSEVIC, N.; BAZADONA, D. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. **Biomolecules. Switzerland**, v. 6, p. 6-19, 2016.
- TRAUMATOLA, A.; LANZILLOTTA, C.; PERLUIGI D.; BUTTERFIELD, A. Oxidative Stress, Protein Modification and Alzheimer Disease. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 88-96, 2017.
- ZHOU, s.; YU, G.; CHI, L.; ZHU, J.; ZHANG, W. Neuroprotective effects of edaravone on cognitive deficit, oxidative stress and tau hyperphosphorylation induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **NeuroToxicology**, v. 38, p. 136-145, 2013.