

EFEITO NEUROPROTETOR DA INOSINA SOBRE DÉFICITS DE MEMÓRIA E ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DA $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPASE EM CÉREBRO DE RATOS SUBMETIDOS AO UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER

FERNANDA TEIXEIRA¹; MAYARA SOARES²; BRUNA MATTOS³; LUIZA SPOHR⁴, CARLUS AUGUSTU TAVARES COUTO⁵; ROSELIA SPANEVELLO⁶.

¹UFPEL – fe.t@hotmail.com

²UFPEL – mspereirasoares@gmail.com

³UFPEL – bruna.mtt@hotmail.com

⁴UFPEL – luizaspohr@hotmail.com

⁵UFPEL – carlusatc@gmail.com

⁶UFPEL – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva de memória e da capacidade cognitiva (WOODS et al. 2016). Várias alterações moleculares já foram descritas na DA, como a hiperfosforilação da protína TAU e o acúmulo de proteínas β amilóides. Essas alterações tem sido associadas com danos oxidativos e inflamatórios em determinadas regiões cerebrais como hipocampo e córtex cerebral, que por sua vez, culminam na falta de energia e na disfunção sináptica (QUERFUTH et al. 2010).

A $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase é uma enzima essencial para a manutenção do equilíbrio iônico dos neurônios, regulando a entrada de K^+ com a saída de Na^+ das células (ZHANG et al. 2013). Alterações na atividade desta enzima podem afetar a transmissão sináptica e os processos de aprendizado e memória e assim contribuir para os mecanismos de neurodegeneração associados com a DA (ZHANG et al. 2013 e PACHECO et al. 2018).

Cabe-se ressaltar que os fármacos usados atualmente para a DA além de apresentarem efeitos colaterais indesejáveis limitam-se apenas a estabilização ou uma melhora temporária do paciente. Desta forma, é relevante a busca de novos compostos que possam interagir de forma mais específica com componentes fisiopatológicos dessa doença, contribuindo assim para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes.

A inosina, um nucleosídeo formado através da desaminação da adenosina, possui importantes ações neuroprotetoras e imunomoduladoras em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson (CIPRIANI et al. 2014) e esclerose múltipla (VICENZI et al. 2013). Desta forma, em uma perspectiva nova e promissora esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inosina na memória e na atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos a um modelo experimental de DA.

2. METODOLOGIA

2.1 Protocolo experimental

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (CEEA-UFPEL 4808/2017). Trinta ratos machos adultos Wistar foram divididos em três grupos: I - controle (C), II - estreptozotocina (STZ) e III - STZ + inosina. Os animais dos grupos II e III foram submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer através da injeção

intracerebroventricular (icv) de STZ (3 mg/kg). Após três dias deste procedimento, os animais do grupo III receberam inosina por via intraperitoneal (50 mg/kg) durante 25 dias, enquanto os animais dos grupos I e II receberam o mesmo volume de solução salina. Na última semana de tratamento, foi realizado os testes comportamentais do campo aberto e reconhecimento de objetos. Após o término do período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo e o córtex cerebral foram separados para análise da atividade da enzima Na^+,K^+ , ATPase.

2.2 Testes comportamentais (Campo aberto e Reconhecimento de objetos)

O teste do campo aberto foi realizado segundo Gutierrez et al. (2012). Os animais foram colocados individualmente em um dos quatro cantos do aparato permanecendo no mesmo por 5 minutos. Esse aparato consistiu em uma arena quadrada medindo 56 x 40 x 30 cm, sendo a base dividida em 12 quadrados (12 x 12 cm). Durante os 5 minutos, foram registrados o número de cruzamentos totais. No teste de reconhecimento de objetos os animais foram colocados individualmente na caixa com dois objetos idênticos (objetos A e B) por cinco minutos para explorar livremente (treinamento). Após duas horas, os animais foram colocados novamente na caixa por cinco minutos, mas um dos objetos anteriores (B) foi substituído por um novo objeto (objeto C). O tempo gasto explorando o objeto familiar e novo foi registrado. Os resultados foram calculados conforme o índice de reconhecimento = $\text{TC} / (\text{TA} + \text{TC})$ (DA SILVA et al. 2007).

2.3 Atividade da enzima Na^+,K^+ ,ATPase

A atividade da enzima Na^+,K^+ , ATPase foi realizada de acordo com a Carvalho et al. (2015) com modificações. A reação foi iniciada pela adição do substrato ATP a uma concentração final de 3 mM. Após 30 minutos a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi quantificado pelo método de Chan et al. (1986) utilizando verde de malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em 630 nm. A atividade específica de Na^+,K^+ ,ATPase foi expressa em nmol de Pi/mg de proteína/min.

2.4 Dosagem de proteínas

Os níveis de proteína foram medidos pelo método de Coomassie blue de acordo com Bradford (1976).

2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguidas de post hoc de Tukey e considerados significativos com valores $P < 0,05$. Os valores foram expressos com média \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao campo aberto, não foram observadas alterações na locomoção dos animais (Figura 1). Já no teste do reconhecimento de objetos, o STZ causou um déficit na memória, a qual foi prevenido após o tratamento com inosina (50 mg/kg) ($P < 0,01$) (Figura 1).

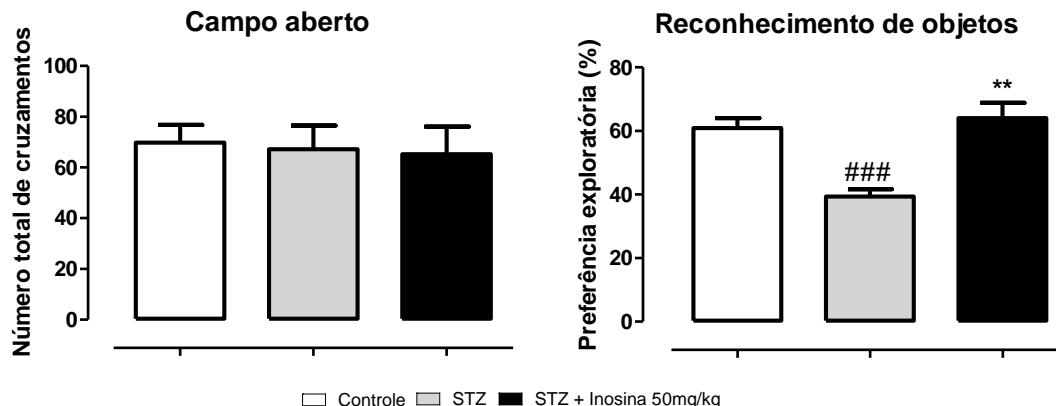


Figura 1. Efeito do tratamento com inosina (50 mg/kg) no teste de campo aberto e reconhecimento de objetos de animais submetidos ao modelo experimental da doença de Alzheimer. Dados são expressos como média \pm erro padrão. *** significa diferença do grupo controle ($P<0.001$) e ** significa diferença do grupo STZ/salina ($P<0.01$).

Além disso, os dados demonstraram que a administração de STZ causou um aumento na atividade da Na^+,K^+ -ATPase em hipocampo e córtex cerebral ($P<0.05$, figura 2) o que corrobora com os resultados encontrados por estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (PACHECO et al. 2018). O tratamento com inosina (50 mg/kg) foi capaz de prevenir essas alterações tanto em hipocampo quanto em córtex cerebral (Figura 2).

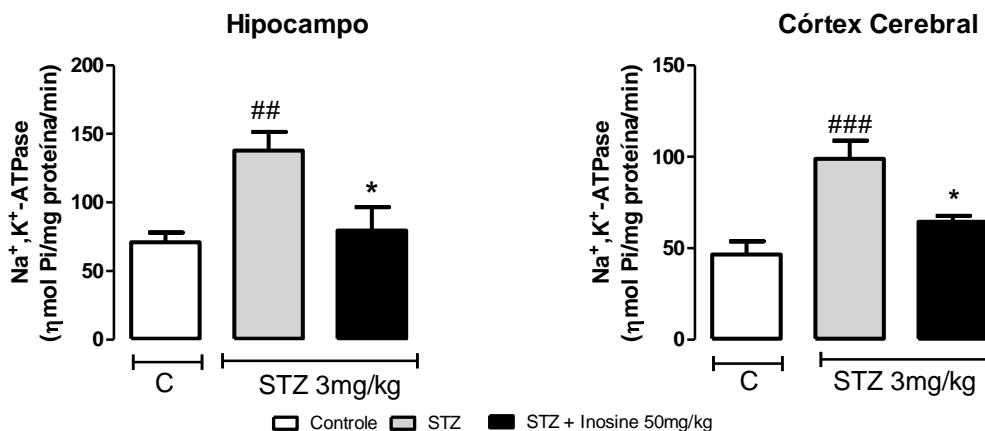


Figura 2. Efeito do tratamento com inosina (50 mg/kg) na atividade da enzima Na^+,K^+ -ATPase em hipocampo e córtex total de animais submetidos ao modelo experimental da doença de Alzheimer. Dados são expressos como média \pm erro padrão. ** $P<0.01$ e *** $P<0.001$ em relação ao grupo controle. * $P<0.05$ em relação ao grupo STZ/salina.

Estudos prévios têm demonstrado que a inosina tem capacidade de melhorar os déficits cognitivos em ratos velhos e que esse efeito pode estar associado ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (RUHAL et al. 2018). Em relação aos resultados demonstrados neste trabalho, foi observado que a inosina é capaz de modular a atividade da enzima Na^+,K^+ -ATPase em cérebro de ratos submetidos a um modelo de DA. Este efeito pode reestabelecer o metabolismo energético no sistema nervoso e ser um mecanismo associado a melhora da memória observada nos animais tratados com inosina.

4. CONCLUSÕES

O tratamento com inosina foi capaz prevenir o déficit de memória memória e as alterações na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo em um modelo experimental de DA sugerindo que esta molécula possui um potencial terapêutico em desordens neurodegenerativas. Entretanto mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos nas atividades biológicas dessa molécula.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-54. 1976.

CARVALHO FB, GUTIERRES JM, BOHNERT C, ZAGO AM, ABDALLA FH, VIEIRA JM, et al. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 26(4):378-90. 2015.

CIPRIANI S, BAKSHI R, SCHWARZSCHILD, MA. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. 22;274:242-9. 2014.

Da SILVA AL, PIATO AL, FERREIRA JG, MARTINS BS, NUNES DS, ELISABETSKY, E. Promnesic effects of Ptychopetalumolacoides in aversive and non-aversive learning paradigms. **Journal of Ethnopharmacology**. 109(3):449-57. 2007.

GUTIERRES JM, CARVALHO FB, SCHETINGER MR, RODRIGUES MV, SCHMTAZ R, PIMENTEL VC. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**. 91(23- 24):1221-8. 2012.

PACHECO SM, SOARES MSP, GUTIERRES JM, GERZSON MFB, CARVALHO FB, AZAMBUJA JH, SCHETINGER MRC, STEFANELLO FM, SPANEVELLO, RM. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. Jun;56:193-204. (2018).

QUERFURTH HW, LAFERLA FM. Mechanisms of Disease Alzheimer's Disease. **The new england journal of medicine**. 362;4 nejm.org january 28, 2010.

VINCENZI F, CORCIULO C, TARGA M, MERIGHI S, GESSI S, CASETTA I, GENTILE M, GRANIERI E, BOREA PA, VARANI K. Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated. **European Journal of Immunology**. 43(8):2206-16. 2013.

WOODS LT, AJIIT D, CAMDEN JM, ERB L, WEISMAN GA. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**. 104: 169-179. 2016.

ZHANG LN, SUN YJ, PAN S, LI JX, QU, YE, LI Y, et al. $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. **Fundamental Clinical Pharmacology**. 27(1):96-103. 2013.