

ÁCIDO TÂNICO PREVINE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA EM UM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER

ALANA SEIXAS DE FARIAS¹; MARIANA FREIRE BARBIERI GERZSON²; NATÁLIA
BONA³; MAYARA SOARES⁴; PATHISE OLIVEIRA⁵; FRANCIELI MORO
STEFANELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – alana_seixasfarias@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mgerzon@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – natinhabona@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mspereirasoares@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – pathisesouto@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O ácido tânico (AT) é um tanino polifenol, polímero de ácido gálico, presente em diferentes plantas com propriedades neuroprotetoras e antioxidantes já comprovadas (GÜLÇİN et al., 2010; BRAIDY et al., 2017). Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* em um modelo de animais transgênicos com Doença de Alzheimer (DA) demonstraram o efeito do composto nessa doença, porém, nenhum estudo até o momento foi executado para avaliar a ação do AT na Doença de Alzheimer do tipo Esporádica (DAE), a qual compreende 85% dos casos (ANAND et al., 2014).

É bem conhecido que a DA é uma doença neurodegenerativa incapacitante que leva à perda progressiva da função mental, comportamental e capacidade de aprendizagem, afetando aproximadamente 44 milhões de pessoas em todo o mundo e apresenta como um sinal bastante precoce uma diminuição do consumo de glicose cerebral (ANAND et al., 2014). A administração de estreptozotocina (STZ) pela via intracerebroventricular (icv) mimetiza as alterações no metabolismo de glicose presente nos cérebro de pacientes com a DA sendo bastante utilizada como um modelo de Doença Esporádica do tipo Alzheimer (LANNERT e HOYER 1998).

Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na instalação e/ou na progressão de doenças neurodegenerativas, portanto, compostos antioxidantes como o AT, podem ser uma interessante estratégia na prevenção destas doenças (GÜLÇİN et al., 2010). Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito do AT sobre parâmetros de estresse oxidativo em um modelo experimental animal de Doença Esporádica do tipo Alzheimer induzida por STZ, com o intuito de verificar o potencial efeito neuroprotetor do composto nesse modelo onde o mesmo já demonstrou resultados promissores.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300g) os quais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram mantidos em condições padrão em um ambiente com temperatura e umidade controlada sob o ciclo claro/escuro. As dietas, tanto sólida quanto hídrica, foram fornecidas *ad libitum* e os animais colocados em gaiolas padrão (máximo de 5 animais por gaiola). O número de animais e a dose do composto foram os mínimos necessários para

demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas nacionais para o estudo com animais de laboratório, conforme as orientações do COBEA (CEEA 4611-2015).

Os animais foram pré-tratados com ácido tânico (30 mg/kg, via oral) ou água uma vez ao dia por 21 dias. Após o tratamento foi realizado o procedimento cirúrgico para a indução da Demência Esporádica do tipo Alzheimer com injeção intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ). Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e após perda dos movimentos musculares esqueléticos realizou-se tricotomia da região do crânio, e a seguir feita antisepsia cutânea. Os animais foram posicionados em aparato estereotáxico e realizou-se uma incisão na linha média sagital e um *scalp*. As coordenadas esterotáxicas para o ventrículo lateral foram de acordo com PAXINOS E WATSON (1986). Através de um orifício na calvária do animal, uma seringa de 28-gauge Hamilton® de 10 µL anexada no aparato estereotáxico foi manualmente deslocada através de um pistão em cada ventrículo lateral. Após o término deste procedimento, a pele foi suturada com fio de náilon agulhado 4.0, e nova antisepsia realizada no local com solução de iodo 2%. A seguir colocaram-se os animais em caixas sendo periodicamente inspecionado para avaliação clínica geral pós-operatória.

Uma semana após a cirurgia os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi dissecado e utilizado na determinação dos seguintes parâmetros de estresse oxidativo:

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Foi determinada de acordo com o método descrito por OHKAWA et al., (1979) onde o sobrenadante de tecido foi misturado com ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico e aquecido em banho-maria em ebulição durante 60 min. TBARS foi expresso como nmol TBARS/ mg de proteína.

Determinação do conteúdo de tiolis totais: O método baseia-se na redução do DTNB por tiolis, que, por sua vez se oxida gerando um derivado (TNB) cuja absorbância é determinada espectrofotometricamente a 412 nm (AKSENOV e MARKESBERY, 2001). Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

Medida da atividade da superóxido dismutase: O método utilizado foi conforme descrito por MISRA e FRIDOVICH (1972). Resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

Determinação da atividade da catalase: Foi determinada de acordo com o método de AEBI (1984). Resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPadPrism versão 5.0, as variáveis foram analisadas por ANOVA de duas vias seguida do *post hoc* de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos para um $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A geração de radicais livres após a administração icv-STZ ocorre antes mesmo da apoptose e da neurotoxicidade sináptica. O tecido cerebral contém muitos ácidos graxos insaturados, que são especialmente vulneráveis ao ataque de radicais livres (SHARMA e GUPTA, 2001). O estresse oxidativo leva à modificação de biomoléculas e a uma perda de neurônios que medeiam os comprometimentos comportamentais e os déficits de memória em distúrbios neurodegenerativos relacionados à idade (SHARMA e GUPTA, 2001). Neste trabalho a análise estatística demonstrou um aumento significativo nos níveis de TBARS no hipocampo

dos animais do grupo STZ em comparação ao grupo controle, indicando dano neuronal causado pelo estresse oxidativo nesta estrutura cerebral (Tabela 1). No entanto, o pré-tratamento com AT previne esse aumento [$F_{(1, 15)} = 9,40; P<0,01$] (Tabela 1) demonstrando que as substâncias antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção de doenças neurodegenerativas mantendo o equilíbrio entre antioxidantes e radicais livres (TAN et al., 2012).

A análise estatística não mostrou uma diferença significativa na quantificação de tios totais [$F_{(1, 18)} = 3,68; P>0,05$] no hipocampo dos animais dos grupos testados, sugerindo que tanto o AT quanto o STZ não alteram estes parâmetros (Tabela 1). Da mesma forma, na atividade das defesas antioxidantes, tanto o AT quanto STZ não alteraram as atividades da SOD [$F_{(1, 19)} = 3,68; P>0,05$] e da CAT [$F_{(1, 17)} = 0,49; P>0,05$] no hipocampo dos animais dos grupos tratados (Tabela 1). Este efeito pode ser atribuído a um mecanismo de defesa do hipocampo, o qual possui uma neuroproteção por autofagia ou até mesmo à uma restrição espacial de difusão de STZ no cérebro destes animais devido ao modelo (tempo e dose) utilizados (PAPADAKIS et al., 2013; TERWEL et al., 1995).

Tabela 1. Efeito do tratamento com ácido tântico em marcadores do estresse oxidativo: TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) eSH (conteúdo tiólico total), e na atividade de enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase) em ratos submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer.

Grupos	TBARS (nmol/mg proteína)	SH (nmol/mg proteína)	CAT (unidades/mg proteína)	SOD (unidades/mg proteína)
CTRL	1,11±0,1	282,15±11,82	2,02±0,08	24,41±1,09
AT	1,16±0,08	228,05±20,75	1,72±0,05	22,76±1,23
STZ	1,68±0,17 [#]	214,85±26,71	1,90±0,05	23,78±1,16
AT-STZ	1,01±0,07 ^{**}	247,21±30,39	1,87±0,22	26,93±1,17

Resultados estão expressos como media ± erro padrão. [#] $P<0,05$ quando comparado ao grupo controle (CTRL); ^{**} $P<0,01$ quando comparado ao grupo STZ. ANOVA (two-way) seguido por teste de Bonferroni. CTRL-controle água, AT-ácido tântico, STZ-estreptozotocina, AT-STZ/ ácido tântico-STZ.

4. CONCLUSÕES

Muitas evidências demonstram a relação do estresse oxidativo com a degeneração neuronal, evidenciando, portanto, a importância de antioxidantes, como a AT, no tratamento de desordens neurodegenerativas como a DA. Através dos resultados obtidos pode-se observar que o AT previne a lipoperoxidação induzida por STZ em hipocampo, demonstrando a ação antioxidante e neuroprotetora do composto e, embora mais estudos sejam necessários, apresenta-

se como uma interessante estratégia na prevenção da Doença de Alzheimer Esporádica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol** v.105 p.121-126, 1984.
- ANAND, R. GILL, KD. MAHDI, AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. **Neuropharmacology** v.76, p.27-50, 2014.
- AKSENOV, M.Y. MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.
- BRAIDY, N. JUGDER, BE. POLJAK, A. JAYASENA, T. NABAVI, SM. SACHDEV, P. et al. Molecular targets of Tannic Acid in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research** v.14, n.8, p.861-869, 2014.
- GÜLCİN, I. HUYUT, Z. ELMASTAS, M. ABOUL-ENEIN, H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v.3, p.43-53. 2010.
- LANNERT, H. HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav Neurosci**; v.112, p.1199-1208, 1998.
- MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v.247, p.3170-3175, 1972.
- OHKAWA, H. OHISHI, N. YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979
- PAPADAKIS, M. HADLEY, G. XILOURI, M. HOYTE, LC. NAGEL, S. MCMENAMIN, MM. et al Tsc1 (hamartin) confers against ischemia by inducing autophagy. **Nat Med** v.19, p.351-357, 2013.
- PAXINOS, G. WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 1986.
- SHARMA, M. GUPTA, YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sciv.** 68, p.1021-1029, 2001.
- TAN, HP. HUA WONG, DZ. KIONG LING, S. CHUAH, CH. ABDUL KADIR, H. Neuroprotective activity of galloylatedcyanogenicglucosides and hydrolysable tannins isolated from leaves of *Phyllagathisrotundifolia*. **Fitoterapia** v.83 n.1, p.223-229, 2012.
- TERWEL, D. PRICKAERT, J. MENG, F. JOLLES, J. Brain enzyme activities after intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats receiving acetyl-L-carnitine. **European Journal of Pharmacology** v.287, n.1, p.65-71, 1995.