

INOSINA PREVINE DÉFICIT DE MEMÓRIA E MODULA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS COLINÉRGICAS EM HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER

FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA¹; CHARLES ELIAS ASSMANN²; KARINA PEREIRA LUDUVIDO³; JULIA MELLO⁴; JULIANE CARDOSO⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹UFPEL – fe.t@hotmail.com ²UFSM – charles.ufsm@gmail.com

³UFPEL – karina_luduvido@outlook.com ⁴UFPEL – julia_eisenhardt@hotmail.com

⁵UFPEL – ju.souza591@gmail.com ⁶UFPEL – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença degenerativa, lenta e progressiva (Woods et al., 2016). É caracterizada pela degeneração ou morte dos neurônios, afetando principalmente o sistema colinérgico. A síntese do neurotransmissor acetilcolina é realizada pela enzima colina-acetiltransferase (ChAT), a partir dos substratos acetil-CoA e colina, e a degradação do mesmo é realizada pela enzima denominada acetilcolinesterase (AChE). Disfunções nessas enzimas são responsáveis por alterar a concentração do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica e estão envolvidas diretamente em alterações nos processos de aprendizagem e memória (Contestabile et al., 2011). A neurotransmissão colinérgica prejudicada pode contribuir para a formação das placas β -amilóide e também aumentar a fosforilação da proteína tau, os principais componentes fisiopatológicos presentes na DA (Schliebs et al., 2011).

A inosina é um nucleosídeo de purina formado pela desaminação da adenosina. É relatado que este nucleosídeo exerce efeitos biológicos potentes possivelmente por meio de suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Haskó et al., 2004, Dachir et al., 2014). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inosina na memória e na expressão das enzimas AChE e ChAT em cérebro de ratos submetidos modelo experimental de demência esporádica do tipo Alzheimer.

2. METODOLOGIA

2.1 Protocolo experimental:

Os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo CEEA-UFPEL 4808/2017. Quarenta ratos machos adultos Wistar foram divididos em quatro grupos: I - controle (C), II – estreptozotocina (STZ), III -STZ + inosina 50 mg/kg e IV -STZ + inosina 100 mg/kg. Os animais dos grupos II, III e IV 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 e IV receberam inosina por via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente, 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, os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo e o córtex cerebral foram separados para análise da expressão da enzima AChE e ChAT.

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 = $TC / (TA + TC)$ (Da Silva et al., 2007).

2.3 Expressão gênica das enzimas AChE e ChAT:

A expressão do mRNA dos genes das enzimas AChE e ChAT das amostras de hipocampo e córtex cerebral de ratos foi realizada por reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Resumidamente, o RNA foi isolado e extraído, foi adicionado reagente TRIzol® às amostras e o conteúdo de RNA foi medido para etapas posteriores. O RNA foi tratado posteriormente com DNase e, em seguida, submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA usando o kit de síntese de cDNA iScript, contendo a enzima transcriptase reversa iScript. Por fim, a expressão gênica foi realizada usando o QuantiFast SYBR® Green PCR Kit e o cDNA de cada amostra. Para normalizar a análise, o gene da β -actina foi usado como controle de manutenção, conforme descrito na literatura (Assmann et al., 2018).

2.4 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

Os testes comportamentais indicaram através do teste do campo aberto, que os animais não apresentaram alterações locomotoras. Na tarefa de reconhecimento de objetos, que avalia a memória dos animais, o grupo STZ apresentou menor preferência pelo objeto novo, quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com inosina em ambas as doses foi capaz de prevenir os déficits de memória causados pelo STZ (figura 1). Esse resultado corrobora com dados prévios da literatura, como apresentado no trabalho de Ruhel e Dhingra (2018), no qual o tratamento com inosina foi capaz de melhorar a memória em ratas velhas, avaliada nos testes comportamentais do plus maze e moris water maze. Entretanto é importante destacar que neste trabalho as doses de inosina que apresentaram os melhores resultados foram as de 100 e 200 mg/kg (Ruhel e Dhingra, 2018) enquanto que os resultados do presente estudo indicaram que a dose 50 mg/kg foi eficaz em prevenir déficits de memória em um modelo de DA.

O neurotransmissor acetilcolina está diretamente associado a processos cognitivos. Alterações nas enzimas ChAT e AChE foram correlacionadas com o declínio cognitivo em modelos experimentais de DA (Gutierrez et al., 2014; Sorial et al., 2017; Pacheco et al., 2018). Assim, os resultados demonstraram que há uma menor expressão de AChE em hipocampo no grupo STZ quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com inosina na dose de 50 mg/kg foi capaz de prevenir essa alteração (figura 2A).

Em relação à enzima de síntese, o STZ causou uma diminuição na expressão da ChAT, corroborando com dados encontrados na literatura (Biasibetti et al., 2017). Dessa forma, pode-se sugerir que a produção do neurotransmissor em ambas as estruturas cerebrais pode estar diminuída. A inosina, em ambas as concentrações, foi capaz de reverter a alteração causada por STZ na expressão da ChAT conforme observado na figura 2 C e D. O aumento da expressão da

ChAT a partir do tratamento com inosina, pode acarretar em aumento dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica, podendo ser esse o mecanismo responsável pela melhora da capacidade cognitiva dos animais, conforme o resultado observado no teste comportamental de reconhecimento de objetos.

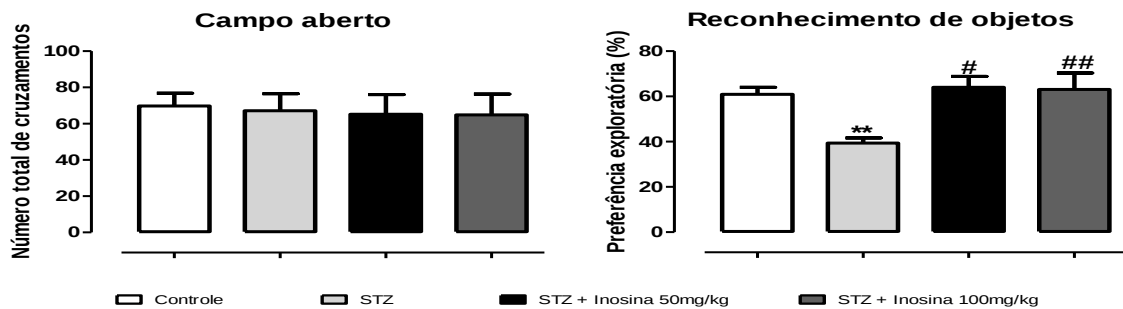


Figura 1. Efeito do tratamento com inosina na dose de 50mg/kg e 100mg/kg no teste de campo aberto e reconhecimento de objetos de animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer. Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. ** $P < 0.01$ quando comparado ao grupo controle. # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ quando comparado ao grupo STZ.

qRT-PCR

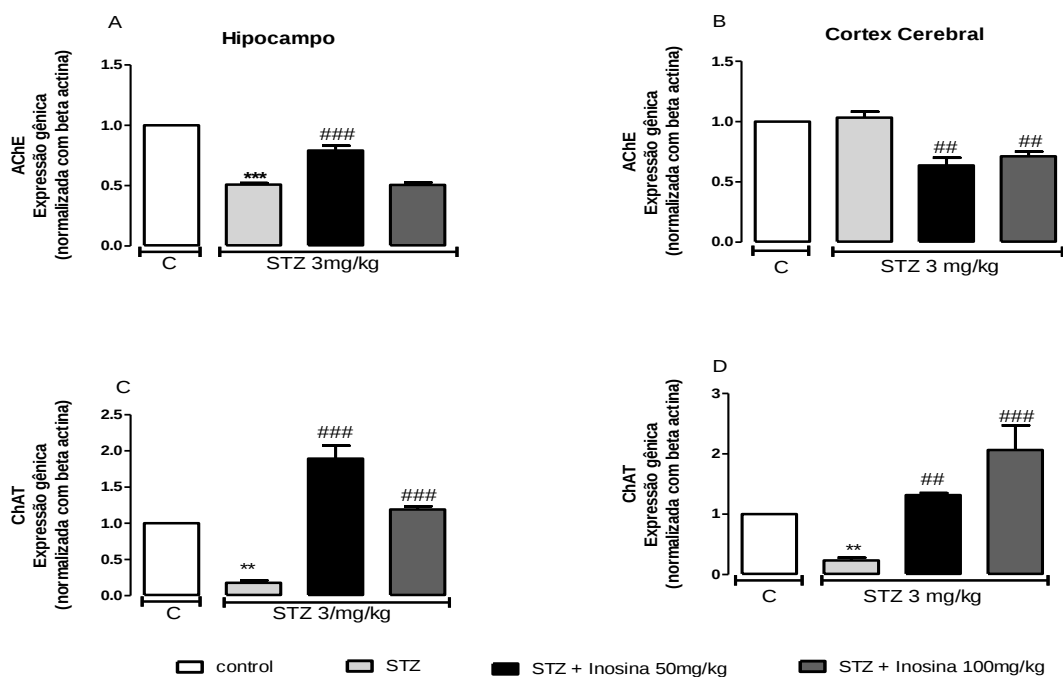


Figura 2. Efeito do tratamento com inosina na dose de 50 mg/kg e 100 mg/kg na expressão das enzimas AChE e ChAT em hipocampo (A e C) e córtex total (B e D) de animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer. Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ quando comparado ao grupo controle e ## $P < 0.01$ e #### $P < 0.001$ quando comparado ao grupo STZ.

4. CONCLUSÕES

O tratamento com inosina foi capaz de prevenir os déficits de memória induzidos por um modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer bem como modular a expressão das enzimas AChE e ChAT em hipocampo e córtex cerebral de ratos. Desta forma, pode-se sugerir o potencial terapêutico para a inosina em doenças neurodegenerativas como a DA. Porém, estudos adicionais são necessários para averiguar o efeito desse tratamento nos demais aspectos fisiopatológicos desse modelo a fim de confirmar o mecanismo de ação responsável pelas ações biológicas dessa purina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSMANN, CE; CADONÁ, FC; BONADIMAN, BDSR; DORNELLES, EB; TREVISAN, G; CRUZ, IBMD. Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 103:1253-1261, 2018.
- BIASIBETTI, R; ALMEIDA, DOS SANTOS JP; RODRIGUES, L; WARTCHOW, KM; SUARDI, LZ; NARDIN, P; SELISTRE, NG; VÁZQUEZ, D; GONÇALVES, CA. CONTESTABILE, ANTONIO. The history of the cholinergic hypothesis. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 334-340, 2011.
- 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):449-457, 2007.
- DACHIR, S; SHABASHOV, D; TREMBOVLER, V; ALEXANDROVICH, AG; BENOWITZ, LI; SHOHAMI, E. Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury. **Brain Research**, v. 1555, p. 78-88, 2014.
- GUTIERRES, JM; CARVALHO, FB; SCHETINGER, MR; MARISCO, P; AGOSTINHO, P; RODRIGUES, M; RUBIN, MA; SCHMATZ, R; DA SILVA, CR; DE P, COGNATO G; FARIAS, JG; SIGNOR, C; MORSCH, VM; MAZZANTI, CM; BOGO, M; BONAN, CD; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. **Life Science**, 96:7-17, 2014.
- GUTIERRES, JM; CARVALHO, FB; SCHETINGER, MR; RODRIGUES, MV; SCHMATZ, R; PIMENTEL, VC; VIEIRA, JM; ROSA, MM; MARISCO, P; RIBEIRO DA, LEAL C; RUBIN, MA; MAZZANTI, CM; SPANEVELLO, R. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life Sciences**, 91(23- 24):1221-1228, 2012.
- HASKÓ G, SITKOVSKY M V, SZABÓ C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. **Trends Pharmacological Science**, 25:152-157. 2004.
- Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behavioural Brain Research**, 316: 205-214, 2017.
- 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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 56:193-204, 2018.
- RUHAL, POONAM; DHINGRA, DINESH. Inosine improves cognitive function and decreases aging-induced oxidative stress and neuroinflammation in aged female rats. **Inflammopharmacology**, 26: 1317-1329, 2018.
- SCHLIEBS, REINHARD; ARENDT, THOMAS. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555-563, 2011.
- SORIAL, ME; SAYED, NSED. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Archives of Pharmacology**, 390:581-593, 2017.
- 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.