

EFEITO PROTETOR DE 6-((4-FLUOROFENIL) SELANIL)-9H-PURINA NO DÉFICIT DE MEMÓRIA E NA HIPERALGESIA MECÂNICA EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER

MIKAELA PEGLOW PINZ¹; CAREN ALINE RAMSON DA FONSCECA²; GUSTAVO BIERHALS BLÖDORN³; DIEGO ALVES⁴; ETHEL ANTUNES WILHELM⁵; CRISTIANE LUCHESE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – mikaelappinz@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carenramson@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gustavoblodorn@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – diego.alves@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (coorientadora)

⁶Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por alterações bioquímicas como a formação de placas senis contendo o peptídeo β -amilóide (A β) (AVRAMOVICH et al., 2002) e emaranhados neurofibrilares intracelulares que tem em sua composição a proteína tau hiperfosforilada (SELKOE, 2004). Durante o curso clínico da doença, além do comprometimento cognitivo e a perda de memória ocorre o surgimento de sintomas neuropsiquiátricos (irritabilidade, depressão, agitação e ansiedade) (MASTERS et al., 2015). Além disso, a agitação pode ser causada por dor subdiagnosticada e não tratada (SAMPSON et al., 2015). Adicionalmente, na DA, ocorrem prejuízos na neurotransmissão como por exemplo a redução do neurotransmissor acetilcolina (ACh), acarretando em prejuízos no aprendizado e na memória no curso desta doença (SCHLIEBS e ARENDT; 2006). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por degradar a ACh em colina e ácido acético. Além do mais, sabe-se que este neurotransmissor também pode modular a ativação da microglia (CARNEVALE et al., 2007). Kokras e colaboradores (2018), demonstram que pacientes com a DA apresentaram níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), em comparação com pacientes saudáveis. Nesse sentido, o aumento da atividade e / ou expressão da AChE pode estar associado ao déficit colinérgico e aumento do processo inflamatório.

A experiência clínica tem demonstrado que os medicamentos utilizados para a DA podem ser apenas paliativos, pois não abordam a etiologia complexa da doença, além do mais, esses medicamentos causam efeitos adversos bastante significativos (ALI, et. al., 2015). Baseado nisso, nosso grupo de pesquisa tem interesse em alcançar uma eficácia terapêutica para esta doença. Recentemente, mostramos que o composto 6-((4-fluorofenil) selanil)-9H-purina (FSP) apresentou efeito na melhora da memória através do seu efeito anticolinesterásico em córtex cerebral de camundongos (DUARTE et al., 2017). Neste contexto, este composto torna-se um agente promissor a ser testado na prevenção da memória e hiperalgesia mecânica em um modelo DA em camundongos.

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (CEEAA 1974-2016). Foram utilizados camundongos machos adultos da raça Swiss (20-25 g) provenientes do Biotério Central da UFPEL. O composto FSP (figura 1) foi sintetizado de acordo com Duarte et al. (2017). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (8 animais por grupo). Trinta minutos antes de iniciar a

indução, os animais do grupo sham e do grupo A β receberam óleo de canola (10 ml/kg) por via *per oral* (p.o.), enquanto os animais pertencentes aos grupos FSP e A β +FSP receberam o composto FSP (1 mg/kg) (p.o.). Posteriormente os grupos A β e A β +FSP foram induzidos por via intracerebroventricular (i.c.v.) com o A β (3 nmol/ 3 μ l/por sitio) e os animais dos grupos sham e FSP receberam solução salina 0,9% (3 μ l/ por sitio) (IANISKI et al., 2012). No 1º dia do protocolo experimental, realizou-se o teste do von frey, através de um analgesímetro digital (Insight, Brasil) para avaliação da hiperalgesia mecânica (CHAPLAN et al., 1994). Este mesmo teste foi repetido no 8º e 16º dia do protocolo experimental. Nos 13º e 14º dias após a indução foi realizada a tarefa da esQUIVA inibitória (SAKAGUCHI et. al., 2006), para avaliar a memória aversiva não espacial de longo prazo. No dia seguinte, os animais foram submetidos à eutanásia e as estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) foram removidas para determinação da expressão da AChE e TNF- α (LIVAK et al., 2001). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey para a expressão relativa da AChE e do TNF- α e Newman Keuls para os demais testes. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

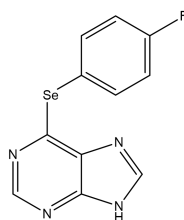


Figura 1- Estrutura química de 6 - ((4-fluorofenil) selanil) -9H-purina (FSP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Tabela 1, não houve diferença entre os grupos no 1º dia do protocolo experimental em que se realizou o teste do von-frey. No entanto, no 8º dia, o A β ocasionou um aumento da hiperalgesia mecânica em relação ao grupo sham, indicando o envolvimento da dor no curso desta doença. Surpreendentemente, no 15º dia de tratamento, o FSP reduziu a frequência de resposta ao estímulo do von frey, indicando um efeito anti-hiperalgésico do composto em animais induzidos pelo A β (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do FSP e / ou peptídeo β -amilóide (A β) na hiperalgesia mecânica no teste de von frey (os valores foram expressos em gramas).

Grupos	Dia 1	Dia 8	Dia 16
sham	12.39 \pm 0.38	10.91 \pm 0.51 ^{##}	11.69 \pm 0.33 ^{####}
FSP	11.77 \pm 0.28	10.66 \pm 0.27 [#]	10.94 \pm .22 ^{####}
A β	11.91 \pm 0.39	9.13 \pm 0.20 ^{**}	8.92 \pm 0.19 ^{****}
A β + FSP	12.02 \pm 0.36	9.71 \pm 0.39	11.31 \pm 0.21 ^{####}

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de 8 animais por grupo. (**) e(****) representam $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente em comparação com o grupo sham. (#),(##) e (####) representam $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,0001$, respectivamente em comparação com o grupo A β (análise de variância de uma via/ teste de Newman-Keuls).

Adicionalmente, pode-se observar na figura 2 que não houve diferença entre os grupos na fase do treino da esQUIVA inibitória. Além disso, verificou-se que o A β reduziu o tempo de descida da plataforma, demonstrando que ocorreu um prejuízo na memória não espacial de longo prazo, e a administração de FSP foi capaz de aumentar este tempo (figura 2), indicando uma melhora na memória dos animais induzidos com A β .

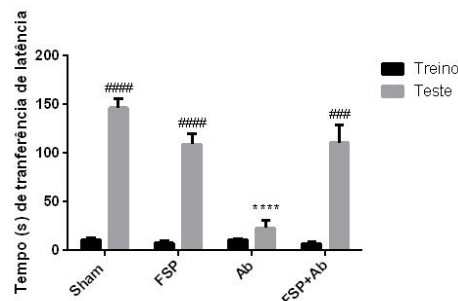


Figura 2- Efeito do FSP na tarefa da esQUIVA inibitória. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de 8 animais por grupo. (****) denota $p < 0,0001$ em comparação com o grupo sham. (###), (####) representam $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente em comparação com o grupo A β (análise de variância de uma via/ teste de Newman-Keuls).

Pode-se verificar na figura 3C um aumento nos níveis de expressão da enzima AChE no hipocampo e o composto foi capaz de proteger contra este aumento. Estes resultados sugerem que o FSP apresentou um efeito anticolinesterásico e este pode ser um possível mecanismo pelo qual houve uma melhora na memória dos animais. Conforme demonstrado na figura 3 houve um aumento na expressão de TNF- α no córtex cerebral (figura 3B) e hipocampo (figura 3D) dos animais induzidos pelo A β . O composto FSP foi capaz de proteger contra este aumento em ambas estruturas (figuras 3B e 3D), indicando um efeito anti-inflamatório. Neste contexto, pode-se sugerir que este efeito do FSP pode contribuir para a redução da hiperalgesia mecânica induzida pelo A β .

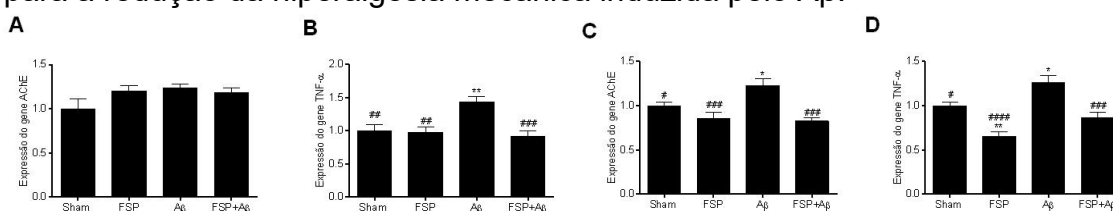


Figura 3- Efeito do tratamento com o FSP na expressão da AChE no córtex cerebral (3A) e hipocampo (3C) e expressão do TNF- α no córtex cerebral (3B) e hipocampo (3D) de camundongos. Os dados são relatados como média \pm erro padrão da média (SEM) de 5 animais por grupo. (*), (**), denota $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente em comparação com o grupo sham. (#), (##), (###), (####) representa $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente em comparação com o grupo A β (análise de variância de uma via / teste de Tukey).

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que o FSP protegeu contra o comprometimento da memória e a hiperalgesia mecânica em um modelo de DA induzido por A β . Além disso, a ação anticolinesterásica e anti-inflamatória do FSP parece contribuir para seus efeitos farmacológicos. Desta forma, o FSP pode ser uma alternativa promissora para a profilaxia da DA, contudo mais estudos são necessários para elucidar outros mecanismos envolvidos nestas ações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASOFU, S.; KIMURA, M.; KOSASA, T.; SAWADA, K.; OGURA, H. Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.175, p. 222-226, 2008.
- ALI, T. B.; SCHLERET, T. R.; REILLY, B. M.; CHEN, W. Y.; ABAGYAN, R. Adverse Effects of Cholinesterase Inhibitors in Dementia, According to the Pharmacovigilance Databases of the United-States and Canada. **Plos One**, v.10, p. e0144337, 2015.
- ALVES, L.; CORREIA, A.S.A.; MIGUEL, R.; ALEGRIA, P.; BUGALHO, P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. **Frontiers in Neurology**, v.3, p.1-20, 2012.
- AVRAMOVICH, Y.; AMIT, T.; YODIM, M. B. H. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Stimulate Secretion of Non-amyloidogenic Precursor Protein. **The American Society For Biochemistry and Molecular Biology** v. 277, p. 31466-31473, 2002.
- CARNEVALE, D.; DE SIMONE, R.; MINGHETTI, L. Microglia–neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.6, p. 388-97, 2007.
- CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, p.55-63, 1994.
- DUARTE, L.F.B.; OLIVEIRA, R.L.; RODRIGUES, K.C.; VOSS, G.T.; GODOI, B.; SCHUMACHER, R.F.; PERIN, G.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C.; ALVES, D. Organoselenium compounds from purines: Synthesis of 6-arylselanylpurines with antioxidant and anticholinesterase activities and memory improvement effect **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, p.6718-6723, 2017.
- DUMAS, J. A. e NEWHOUSE, P. A. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: Cholinergic functional compensation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.99, p.254-261, 2011.
- IANISKI, F.R.; ALVES, C.B.; SOUZA, A.C.G.; PINTON, S.; ROMAN, S.S.; RHODEN, C.R.B.; ALVES, M.P.; LUCHESE, C. Protective effect of meloxicam-loaded nanocapsules against amyloid β peptide-induced damage in mice. **Behavioural Brain Research**, v.230, p. 100-107, 2012.
- KOKRAS, N.; STAMOULI, E.; SOTIROPOULOS, I.; KATIRTZOGLU, E. A.; SIARKOS, K. T.; DALAGIORGOU, G.; ALEXANDRAKI, K. I.; COULOCHEIRI, S.; PIPERI, C.; POLITIS, A. M. Acetyl Cholinesterase Inhibitors and Cell-Derived Peripheral Inflammatory Cytokines in Early Stages of Alzheimer's Disease. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 38p. 00–00, 2018;
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MASTERS, M.C.; MORRIS, J.C.; ROE, C.M. "Noncognitive" symptoms of early Alzheimer disease: a longitudinal analysis. **Neurology**, v. 84, p. 617-622, 2015.
- European Journal of Pharmacology**, v.530, p.81-87, 2006.
- SAMPSON, E.L.; WHITE, N.; LORD, K.; LEURENT, B.; VICKERSTAFF, V.; SCOTT, S.; JONES, L. Pain, agitation, and behavioural problems in people with dementia admitted to general hospital wards: a longitudinal cohort study. **Pain**, v. 156, p. 675-683, 2015.
- SELKOE, D.J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 1054-1061, 2004.
- SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 555-563, 2011.