

INOSINA RESTAURA DÉFICIT DE MEMÓRIA VIA MODULAÇÃO DE RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS A1 E A2A EM MODELO DE DEMÊNCIA ESPORÁDICA DO TIPO ALZHEIMER EM RATOS

FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA¹; JULIANE DE SOUZA CARDOSO²; KARINE REICHERT³; MARIA ROSA CHITOLINA³; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas – fe.t@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ju.souza591@gmail.com

³ Universidade Federal de Santa Maria – kakareichert@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Santa Maria – mariachitolina@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo relacionado à perda progressiva de memória e da capacidade cognitiva (JAHN et al., 2013; WOODS et al., 2016). A DA é reconhecida como uma prioridade global de saúde pública e ainda que não existem terapias curativas para esta doença (LANE et al., 2018).

Os receptores adenosinérgicos A1 e A2A (A1R e A2AR) estão localizados principalmente nas sinapses, participando do controle e da liberação de neurotransmissores como o glutamato e a acetilcolina, e estão envolvidos no processamento da memória e outros distúrbios cognitivos. As evidências sugerem mudanças na densidade desses receptores nas regiões do cérebro afetadas pela DA. Com o avanço da idade, há uma redução na expressão/densidade de A1R e um aumento em A2AR em regiões como córtex e hipocampo (REBOLA et al., 2003; CUNHA, 2005).

Os fármacos usados atualmente no tratamento da 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 agentes que possam interagir de forma mais específica com componentes fisiopatológicos dessa doença, contribuindo assim para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes (KUMAR et al., 2018).

A inosina, um nucleosídeo formado pela desaminação da adenosina, têm apresentado importantes propriedades terapêuticas em modelos de doenças neurodegenerativas como Parkinson (CIPRIANI et al., 2014) e Esclerose Múltipla (VICENZI et al., 2013). Considerando que a ação da inosina se dá, principalmente, através de sua ligação com receptores de adenosina A1, A2A e A3 (JIN et al., 1988), este estudo teve como objetivo verificar o efeito deste nucleosídeo na memória e na expressão dos receptores A1, A2A em hipocampo e córtex cerebral de ratos em um modelo experimental de DA.

2. METODOLOGIA

2.1 Protocolo experimental: Ratos wistar machos (60 dias) foram divididos em grupos: I - controle, II - STZ, III - STZ + INOSINA 50 mg/kg e IV - STZ + INOSINA 100 mg/kg. Os grupos II, III e IV foram submetidos ao modelo de DA por meio da injeção intracerebroventricular de STZ (3 mg/kg). Após três dias desse procedimento, os animais dos grupos III e IV do grupo receberam inosina, por via intraperitoneal por 25 dias, enquanto os grupos I e II receberam solução salina (CEEA/UFPel:4808). Na última semana de tratamento, foram realizado os testes comportamentais. Após o término do período de tratamento, os animais foram

submetidos à eutanásia onde o hipocampo e o cortex cerebral foram separados para análise da expressão dos receptores adenosinérgicos.

2.2 Testes comportamentais: O teste do campo aberto foi realizado segundo GUTIERRES et al., (2012). Os animais foram colocados individualmente em um dos quatro cantos do aparato permanecendo no mesmo por 5 minutos, registrando 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 e 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).

2.2 Análise da expressão dos receptores adenosinérgicos: A imunorreatividade/expressão do receptor adenosinérgico A1 foi avaliada por análise de Western blot, conforme descrito anteriormente por REBOLA et al., 2005.

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 resultados encontrados no teste de campo aberto demonstraram que nem o STZ, nem o tratamento com a inosina alteraram a locomoção dos animais ($P > 0,05$). Na tarefa de reconhecimento de objeto, que avalia a memória de curto prazo, a porcentagem de preferência exploratória do novo objeto no grupo STZ foi significativamente diminuída quando comparada com o grupo controle ($P < 0,01$) indicando prejuízo de memória. O tratamento com inosina 100 mg/kg aumentou o percentual de preferência exploratória do novo objeto quando comparado ao grupo STZ, demonstrando que a inosina foi capaz de restaurar os déficits de memória induzidos por este modelo experimental (Figura 1).

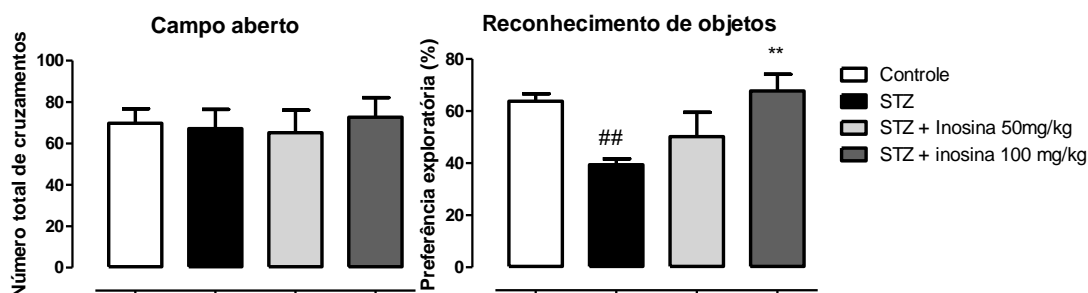


Fig. 1. Efeito do tratamento com inosina (ip 50 mg/kg ou 100 mg/kg) no teste de campo aberto e reconhecimento de objetos de animais submetidos ao modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer. ## significa diferença do grupo controle $P < 0,01$ e ** significa diferença do grupo STZ $P < 0,01$.

Em relação à densidade de receptores adenosinérgicos (figura 2), o A2AR apresenta níveis aumentados no grupo STZ quando comparado ao grupo controle, no hipocampo ($P < 0,001$) e córtex cerebral ($P < 0,001$). No hipocampo, o

tratamento com inosina em ambas as doses foi capaz de reverter essa alteração ($P < 0,001$; $P < 0,01$), enquanto no córtex cerebral apenas a dose de 50mg/kg foi efetiva. Em contraste, observa-se que o STZ foi responsável pelo aumento da densidade de A1R ($P < 0,05$), no hipocampo, e apenas o tratamento com inosina na maior dose foi capaz de reverter essa alteração. Entretanto, o STZ não causou alterações na densidade de A1R no córtex cerebral, embora o tratamento com inosina na maior dose, se mostrou diferente do grupo STZ ($P < 0,001$).

Segundo Pagnussat et al., (2015) a ativação de A2AR é necessária e suficiente para diminuir a memória de curto prazo. Anteriormente, foi observado que o tratamento com inosina evitou a regulação positiva de A2A no modelo de encefalomielite autoimune (JUNQUEIRA et al., 2015) e no modelo de doença de Parkinson (EL-SHAMARKA et al., 2020). Nossos resultados demonstram que a inosina reduziu a expressão de A2AR, corroborando com a literatura, podendo ser um dos mecanismos responsáveis pela melhora da memória observada no teste de reconhecimento de objetos (memória de curto prazo).

Conforme descrito na literatura as implicações dos receptores de adenosina A1 e A2A na neuroproteção parecem diferentes, sendo desejável que uma molécula apresente efeito agonista sobre A1R e efeito antagonista sobre A2AR (ALBASANZ et al., 2008). Embasados nos resultados apresentados, sugerimos que a modulação dos receptores adenosinérgicos seja um dos mecanismos responsáveis pelas ações terapêuticas da inosina, conferindo a neuroproteção observada no comportamento dos animais no modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer, induzida por STZ.

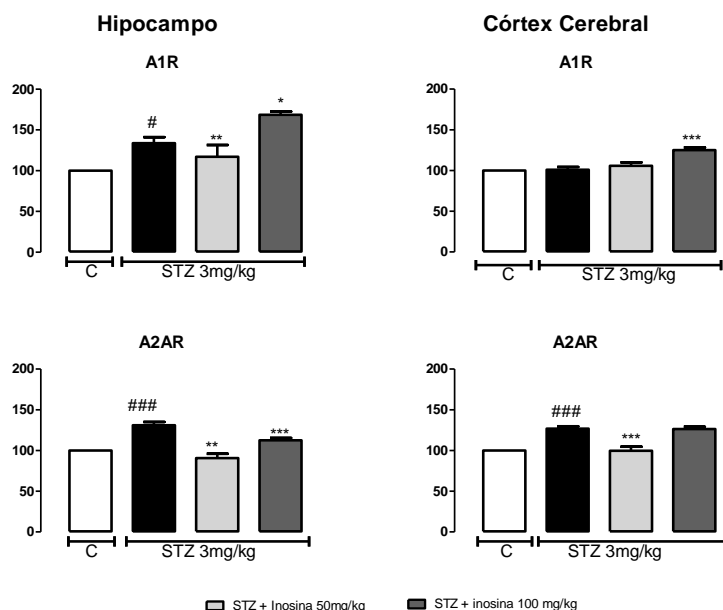


Fig. 2. Análise de Western blot de A1R, A2AR em hipocampo e córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo de demência esporádica tipo Alzheimer tratados com inosina (ip 50 mg/kg ou 100 mg/kg). # ($P < 0,05$) e ### ($P < 0,001$), em comparação com o grupo controle. * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) e *** ($P < 0,001$) em comparação com o grupo STZ ($n = 4-6$ por grupo).

4. CONCLUSÕES

Estudos prévios do nosso grupo vem demonstrando efeitos promissores da inosina em diversos parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares em modelos experimentais de DA. Assim, esses achados juntamente com ação da inosina em receptores adenosinérgicos sugerem que esta purina pode ser uma

estratégia terapêutica inovadora e promissora no tratamento de patologias neurodegenerativas, como a DA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBASANZ, J. L. et al. RESEARCH ARTICLE: Up-regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease. **Brain Pathology**.p.211–219, 2008.
- CIPRIANI, S., BAKSHI, R., SCHWARZSCHILD, M. Protection by inosine in a cellular model of Parkinson's disease. **Neuroscience**.22;274:242-9. 2014.
- CUNHA, R. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**.1: 111–134. 2005.
- Da SILVA, A.L., Promnesic effects of Ptychopetalumolacoides in aversive and non-aversive learning paradigms. **Journal of Ethnopharmacology**.109(3):449-57.2007.
- EL-SHAMARKA, et al. The protective effect of inosine against rotenone-induced Parkinson's disease in mice; role of oxido-nitrosative stress, ERK phosphorylation, and A2AR expression. Naunyn-Schmiedeberg's **Archives of Pharmacology**. 2020.
- GUTIERRES, J.M., et al. 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.
- JAHN, H. Memory loss in Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. 15(4), 445. 2013.
- JIN, X., et al. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **Journal of Clinical Investigation**. P. 2849–2857. 1998.
- JUNQUEIRA, Stella Célio. Inosina previne a resposta inflamatória e nociceptiva induzida pelo modelo experimental de esclerose múltipla. 2015.
- KUMAR, K., et al. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 98, p. 297-307, 2018.
- LANE, C.A., et al. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**. v.25.p:59-70, 2018.
- PAGNUSSAT, N., et al.Adenosine A2A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice.**British Journal of Pharmacology**.172.15 3831-3845.2015.
- REBOLA, N., et al. Subcellular localization of adenosine A1 receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. **Brain research**. 987.1:49-58. 2003.
- REBOLA, N., et al., Long-term Effect of Convulsive Behavior on the Density of Adenosine A1 and A2A Receptors in the Rat Cerebral Cortex. **Epilepsia**. 46:159–165, 2005.
- VINCENZI, F., et al. Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated. **European Journal of Immunology**. 43(8):2206-16. 2013.
- WOODS, L.T., et al. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**.104, May, Pages 169-179. 2016.