

EXTRATO DE AMORA PRETA MELHORA A MEMÓRIA, ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE AMNÉSIA

JULIA EISENHARDT DE MELLO¹; KARINA PEREIRA LUDUVICO²;
ALESSANDRA DOS SANTOS³; SARA KESKE⁴; FRANCIELI STEFANELLO⁵;
ROSELIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – eisenhardtju@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – karina_luduvico@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – ales_santos@outlook.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – saarakeske@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fmstefanello@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo declínio constante da memória, deficiências cognitivas e mudanças de comportamento e personalidade. Ainda, esta doença leva a alterações cognitivas graves o suficiente para interferir nas habilidades diárias dos indivíduos acometidos por essa desordem neurodegenerativa (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

Apesar da etiologia da DA não estar completamente elucidada, algumas hipóteses têm sido associadas à fisiopatologia da doença, como a deposição do peptídeo beta-amilóide, hiperfosforilação da proteína Tau, neuroinflamação e o estresse oxidativo (CHEN, 2018; FERNANDEZ E TORRES-ALEMAN, 2012). Embora nos últimos anos, outros mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DA tenham recebido atenção, o tratamento com o objetivo de melhorar a função colinérgica permanece crítico no manejo de pacientes, sendo que os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) ainda são os fármacos mais promissores. Esses fármacos causam um aumento nos níveis no neurotransmissor acetilcolina restaurando o equilíbrio colinérgico e melhorando a memória. No entanto, a quantidade limitada de medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da DA, bem como, a eficácia e os efeitos colaterais reforçam a importância de estudar compostos mais ativos e promissores que possam auxiliar no tratamento desta doença (KUMAR *et al.*, 2018; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2021).

Frutos ricos em metabólitos secundários dos compostos fenólicos, como as antocianinas, apresentam diversas atividades farmacológicas. Dentre as espécies ricas em antocianinas, destaca-se *Rubus* sp., popularmente conhecido como amora preta. A amora preta é amplamente produzida na região sul do Rio Grande do Sul e que apresenta como antocianina majoritária a cianidina-O-galactosídeo (CHAVES *et al.*, 2018). Portanto, por esta fruta apresentar um alto teor de umidade, culminando em um menor tempo de vida para ser consumida *in natura*, faz-se necessário a produção de um extrato com o objetivo de concentrar corretamente as antocianinas e aumentar o tempo de vida desse extrato natural. Na pesquisa, as atividades biológicas dos extratos ricos em antocianinas já foram atribuídos à ação antioxidante, antimaníaca, redução do risco de obesidade, síndrome metabólica e neuroinflamação (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SPOHR *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2021). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do extrato de *Rubus* sp. na memória, em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da

enzima acetilcolinesterase em hipocampo de ratos submetidos ao déficit de memória induzido por escopolamina (SCO).

2. METODOLOGIA

Os frutos de *Rubus* sp. foram obtidos na Embrapa Clima Temperado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Pelotas/RS. Para o preparo do extrato, os frutos foram picados e 1 g de fruto foi pesado e adicionado de 60 mL de álcool metanólico e levado ao banho de ultrassom por 50 min. Após sonicado, o líquido foi filtrado e levado ao congelador por 24h. Esta solução foi posteriormente levada ao rotaevaporador para a evaporação total do solvente, no qual, por fim, foi liofilizado e armazenado até o uso (CHAVES *et al.*, 2018).

Para o protocolo experimental, foram utilizados ratos Wistar machos, os quais foram divididos em cinco grupos experimentais: I - Controle (salina); II - SCO; III - SCO + *Rubus* sp. (100 mg/kg); 4 - SCO + *Rubus* sp. (200 mg/kg) e V- SCO + donepezil (5 mg/kg). O extrato de *Rubus* sp. e o donepezil foram administrados diariamente durante 10 dias (via oral). No 11º dia, os animais do grupo I receberam injeção de solução salina por via intraperitoneal (i.p.) e os animais do grupo II, III, IV e V receberam injeção de SCO (1 mg/kg) após o treinamento do teste comportamental de reconhecimento de objetos. Vinte e quatro horas após a sessão de treinamento, os animais foram submetidos à sessão de teste do reconhecimento de objetos. Após a análise comportamental os animais foram submetidos à eutanásia e o hipocampo foi removido para posterior análise de espécies reativas de oxigênio (EROS), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da enzima catalase (CAT) e atividade da acetilcolinesterase (AChE). A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 5. Os dados foram expressos utilizando análise de variância por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, sendo $P \leq 0,05$ considerado como diferença significativa. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A memória foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos. Este teste, visa avaliar a capacidade exploratória pela interação dos animais com os objetos, tendo em vista que um dos objetos é substituído na etapa de teste. Os resultados demonstraram que o extrato de *Rubus* sp. nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, e o donepezil, foram capazes de prevenir a perda de memória induzida pela SCO a qual pode ser observada pela maior capacidade exploratória pelo objeto novo no teste de reconhecimento de objeto (Figura 1).

Com relação à avaliação do estresse oxidativo em hipocampo, observou-se um aumento de EROS e de TBARS nos animais que receberam somente SCO. O tratamento com extrato de *Rubus* sp. em ambas as concentrações e o donepezil foram capazes de prevenir essas alterações (Figura 2 A e B). Ainda, foi avaliada a atividade da enzima CAT (Figura 2 C), no qual houve uma redução nos animais que receberam SCO. Entretanto, o extrato de *Rubus* sp. (100 e 200 mg/kg) e o donepezil foram capazes de manter a atividade da enzima como nos animais do grupo controle.

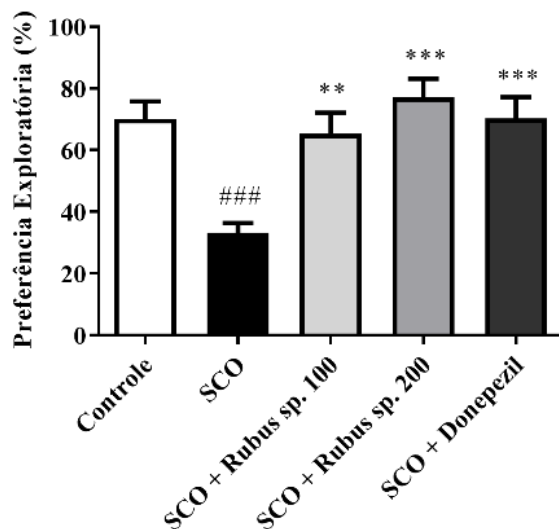


Figura 1: Efeitos do tratamento com extrato de *Rubus* sp. (100 ou 200 mg/kg) e donepezil (5 mg/kg) na memória avaliado pelo teste reconhecimento de objetos em um modelo amnésia induzido por escopolamina (SCO 1 mg/kg). Os dados são expressos como média \pm S.E.M. ### $P < 0,001$ denota diferença significativa em relação ao grupo controle. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo SCO.

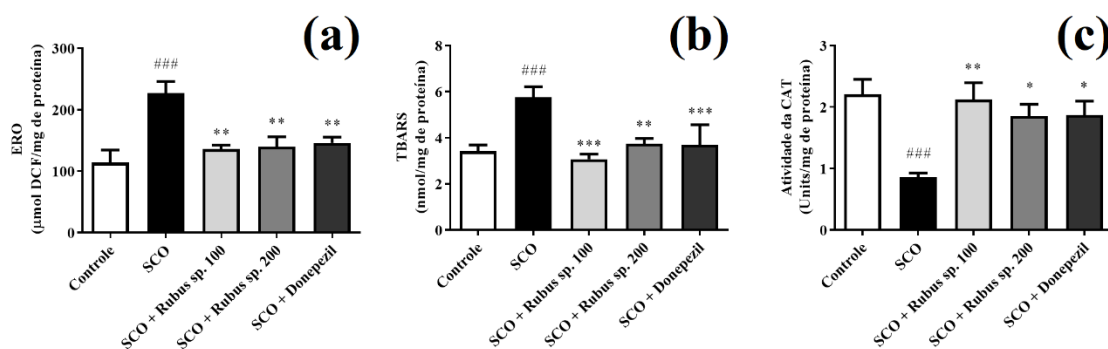


Figura 2: Efeitos do tratamento com extrato de *Rubus* sp. (100 ou 200 mg/kg) e donepezil (5 mg/kg) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (a), substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (b) e na atividade da catalase (c) em hipocampo de ratos submetidos a um modelo de amnésia induzido por escopolamina (SCO 1 mg/kg). Os dados são expressos como média \pm S.E.M. ### $P < 0,001$ como diferença significativa em relação ao grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle.

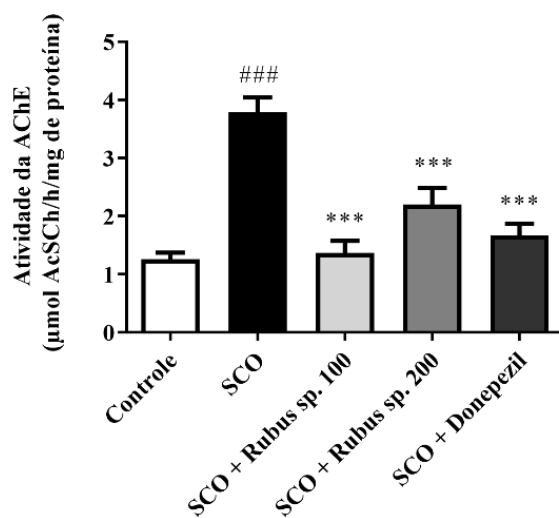


Figura 3: Efeitos do tratamento com extrato de *Rubus* sp. (100 ou 200 mg/kg) e donepezil (5 mg/kg) na atividade da acetilcolinesterase em hipocampo de ratos submetidos a um modelo de amnésia induzido por escopolamina (SCO 1 mg/kg). Os dados são expressos como média \pm S.E.M. ### $P < 0,001$ como diferença significativa em relação ao grupo controle. *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle.

O pré-tratamento com o extrato de *Rubus* sp. foi capaz de prevenir o aumento de ROS e TBARS induzidos pela administração de SCO, bem como de manter a atividade da CAT. Isto reforça a habilidade dos compostos ricos em antocianinas em permeiar a barreira hemato encefálica e proteger o cérebro dos danos causados pelo estresse oxidativo. É importante destacar que o extrato de *Rubus* sp. avaliado em um modelo de neuroinflamação também foi eficaz nos danos causados pelo estresse oxidativo, porém, não demonstrou proteção na atividade na AChE (SOARES, 2021). Neste sentido, ressalta-se que em nosso trabalho, o extrato de *Rubus* sp. preveniu o dano causado na AChE em hipocampo, demonstrando sua ação no sistema colinérgico em modelo de amnésia induzido pela SCO.

4. CONCLUSÕES

O extrato de *Rubus* sp. apresentou atividade antioxidante e anticolinesterásica, a qual pode estar associada a melhora da memória dos animais. Os resultados foram muito similares aos obtidos para o fármaco padrão donepezil. Assim, sugere-se que o extrato de *Rubus* sp. possui um potencial terapêutico promissor para o tratamento ou prevenção de doenças neurológicas que afetam a memória.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DMS-5. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mental. 5ª edição. 2014.
- AA. Alzheimer's Association. Acessado em 11/08/2022. Disponível em: www.alz.org.
- CHEN, Y.G. Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Chinese Medical Journal**. 2018, v.131, p.1618–1624.
- FERNANDEZ, A.M.; TORRES-ALEMAN, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. **Nature Reviews Neuroscience**. 2012, v.13, p.225-239.
- KUMAR K.; KUMAR A.; KEEGAN R.M.; DESHMUKH, R. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 2018, v.98, p.297-307.
- CHAVES, V.C.; BOFF, L.; VIZZOTTO, M.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal Science and Food Agriculture**. 2018, v.98, p.4331-4331.
- OLIVEIRA, P.; CHAVES, V.; SOARES, M.S.P.; BONA, N.P.; MENDONÇA, L.T.; CARVALHO, F.B.; GUTIERRES, J.M.; VASCONCELLOS, F.; VIZZOTTO, M.; VIEIRA, A.; SPANEVELLO, R.M.; REGINATTO, F.H.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**. 2018, v.33, p.1551-1562.
- SPOHR, L.; LUDUVICO, K.P.; SOARES, M.S.P.; BONA, N.P.; OLIVEIRA, P.S.; MELLO, J.E.; ALVEZ, F.L.; TEIXEIRA, F.C.; FELIX, A.O.C.; STEFANELLO, F.M.; SPANEVELLO, R.M. Blueberry extract as a potential pharmacological tool for preventing depressive-like behavior and neurochemical dysfunctions in mice exposed to lipopolysaccharide. **Nutritional Neuroscience**. 2020, v.21, p.1-14.
- SOARES, M.S.P.; LUDUVICO, K.P.; CHAVES, V.C.; SPOHR, L.; MEINE, B.M.; LENCINA, C.L.; REGINATTO, F.H.; SPANEVELLO, R.M.; SIMÕES, C.M.O.; STEFANELLO, F.M. The Protective Action of *Rubus* sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. **Neurochemical Research**. 2021, v.46, p.1129–1140.