

Efeito do ácido biliar TUDCA na homeostase do glucagon em camundongos C57BL/6 modelo experimental da doença de Alzheimer

Palavras-Chave: Alzheimer, Glucagon, TUDCA

Autores/as:

Max de Santana Nazario da Silva [Aluno de Ciências Farmacêuticas da Faculdade Estadual de Campinas]

Co-autores:

Amanda Pellison Nascimento [Aluna de Ciências Farmacêuticas da Faculdade Estadual de Campinas]

Lucas Zangerolamo

Jean Franciesco Vettorazzi

(orientador/a)

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

INTRODUÇÃO:

Distúrbios metabólicos característicos do Diabetes Mellitus Tipo 2 (T2D), como intolerância à glicose e resistência à insulina, foram encontrados em pacientes com DA, sugerindo uma relação íntima entre Diabetes e doença de Alzheimer. Alguns estudos mostraram que os depósitos de proteína β -amilóide, um importante marcador de DA e geralmente identificado no hipocampo, também são encontrados no hipotálamo, resultando em desregulação hipotalâmica e comprometimentos do metabolismo glicêmico. TUDCA é um ácido biliar endógeno com potentes propriedades neuroprotetoras, que regula o metabolismo da glicose melhorando a secreção, a sinalização e degradação da insulina. Camundongos com DA apresentam níveis cerebrais reduzidos de TUDCA e o tratamento com TUDCA reduz o acúmulo de β -amilóide. A homeostase da insulina tem sido explorada em camundongos modelo de DA, contudo, o papel do glucagon sobre os mecanismos que levam às complicações do metabolismo glicêmico relacionadas ao AD, ainda não foi explorado. O glucagon é secretado em baixas concentrações de glicose, agindo, principalmente, no fígado para estimular a gliconeogênese e a glicogenólise, mantendo a níveis normais de glicemia basal. A secreção do glucagon ocorre de maneira similar à da insulina, porém, o estímulo para sua secreção é a baixa concentração de glicose sanguínea.

Nesse projeto, nosso objetivo foi investigar os efeitos do TUDCA na homeostase do glucagon em um modelo de camundongos com DA.

METODOLOGIA:

A. Modelo Experimental de Alzheimer: Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 10 semanas, pesando entre 25 e 30g, obtidos do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1- CTL: receberam injeção de tampão citrato (0,05 mol/L, pH 4,5) intracerebroventricular (ICV) e injeção de PBS intraperitoneal (ip) 2- CTL+TUDCA: receberam injeção de tampão citrato (0,05 mol/L, pH 4,5) ICV e injeção de 300 mg/Kg de TUDCA ip diluído em PBS 3- STZ: receberam injeção de streptozotocina (Sigma-Aldrich) (3 mg/Kg) ICV diluída em tampão citrato e injeção de PBS ip 4- STZ+TUDCA: receberam injeção de streptozotocina diluída em tampão citrato e injeção de 300 mg/Kg de TUDCA ip diluído em PBS. Os animais foram anestesiados com 5% de isoflurano e oxigênio como gás transportador e foram mantidos a uma vazão de 2-3% durante a cirurgia. Os animais foram colocados em um quadro estereotáxico (Stoelting CO.) com barras de nariz e orelha especialmente projetadas para camundongos. Em seguida, 3 mg/kg de streptozotocina ICV ou o tampão de citrato (0,05 mol/L, pH 4,5) foram injetados bilateralmente nos ventrículos laterais. A STZ (Sigma, St. Louis, MO) foi dissolvida em tampão citrato imediatamente antes da injeção, que foi realizada utilizando uma seringa de Hamilton (modelo 701) nas seguintes coordenadas: anteroposterior (AP) -0,5 mm; médio-lateral (ML) \pm 1,1 mm; dorso-ventral (DV) -2,8 mm em relação ao bregma. Um volume total de 1,5 μ L foi injetado em cada hemisfério. A injeção foi conduzida a uma taxa de 0,5 μ L/min, e a agulha foi deixada no local por 3 minutos antes de ser removida lentamente. A injeção foi repetida 2 dias após a primeira injeção de STZ (1,5 mg/kg por dia de injeção). Os animais controle foram infundidos bilateralmente com 1,5 μ l de veículo (tampão de citrato) nos ventrículos laterais. Os sinais clínicos foram monitorados diariamente após a cirurgia, incluindo condições gerais do corpo e desidratação.

B. Teste de reconhecimento de objeto (TRO): O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi realizado para acessar a memória declarativa dos camundongos, e se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (Chen et al., 2013). O teste de comportamento consistiu em 3 fases: a fase de habituação, a fase de amostra e a fase de teste. Na fase de habituação, os camundongos foram habituados na arena de campo aberto em que o experimento foi realizado, onde eles foram mantidos por 10 minutos e então devolvidos para suas respectivas gaiolas. No segundo dia foram realizadas a fase de amostra e a fase do teste, em que os camundongos foram colocados na arena junto com dois objetos idênticos (objeto A), organizados simetricamente no centro da arena, durante 10 minutos. Os animais retornaram para suas gaiolas e depois de 24 horas (terceira fase do experimento) os camundongos retornaram à arena e exploraram 2 objetos, o objeto familiar (A) e um novo objeto

C. Os camundongos tiveram 10 minutos para explorar esses dois objetos. Foi cronometrado o tempo gasto pelos animais explorando cada um dos objetos, na segunda e terceira fase. Os testes comportamentais foram registrados em vídeo que foram posteriormente analisados usando o software Ethovision XT (Noldus, The Netherlands). Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: cheirar, lambear ou tocar o objeto com o nariz ou pernas frontais; ou direcionar o nariz para o objeto a uma distância de \leq 1 cm.

D. Teste de Tolerância à insulina e glucagon: Para o ipITT, os animais dos grupos em estudo no estado alimentado foram pesados, e em seguida foi realizada uma coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia no estado alimentado (tempo 0). Após, foi realizada a aplicação via ip. de 0,75U/kg de insulina, e a glicemia foi verificada nos tempos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 min após a administração.

No ipGluTT, a glicemia de jejum (8h) foi avaliada (tempo 0) e logo após os camundongos foram pesados e receberam 50 μ g/Kg de peso corporal de glucagon via ip. Em seguida, a concentração plasmática de glicose foi avaliada aos 10, 15, 30, 45 e 60 min após a aplicação.

E. Análise Estatística: Os grupos foram analisados pelo teste ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 7. O nível de significância adotado para as análises foi de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os animais que foram tratados com TUDCA tiveram melhoras significativas no teste de reconhecimento de objeto.

A aplicação do teste foi fundamental tanto para avaliar o modelo de DA, quanto para avaliar modulações das funções cognitivas dos animais em função do tratamento com TUDCA, considerando que os animais apresentaram maior índice de preferência pelo objeto novo. Esse resultado indica que o animal teve apresentado um aprendizado entre uma fase e outra do experimento, indicando assim melhora na cognição e memória. O grupo Stz não apresentou resultado significativo no teste de reconhecimento de objeto, visto que o índice de preferência de objeto entre os objetos do experimento ficou próximo de 50% (Figura 1).

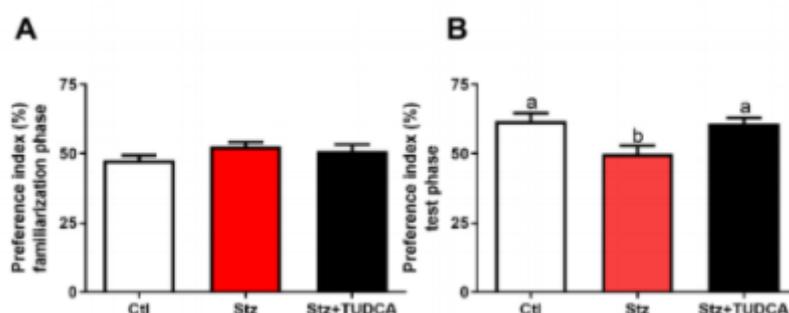


Figura 1: A) índice de preferência da fase de familiarização do TRO. B) índice de preferência do teste do TRO. Os resultados acima representam média SEM(n=7-9). Letras diferentes significam diferença estatística ($p > 0.05$). Análise estatística foi realizada por Anova one-way

O tratamento com TUDCA melhorou a sensibilidade à insulina nos camundongos modelo Alzheimer

Para terminar os estudos em relação ao metabolismo da glicemia dos animais modelo, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à insulina. O experimento indicou que o decaimento da glicemia dos animais estava reduzido nos animais modelo Alzheimer, enquanto os animais tratados com TUDCA apresentaram melhora no decaimento da glicemia no experimento com valores estatisticamente semelhantes com o grupo controle (Figura 2).

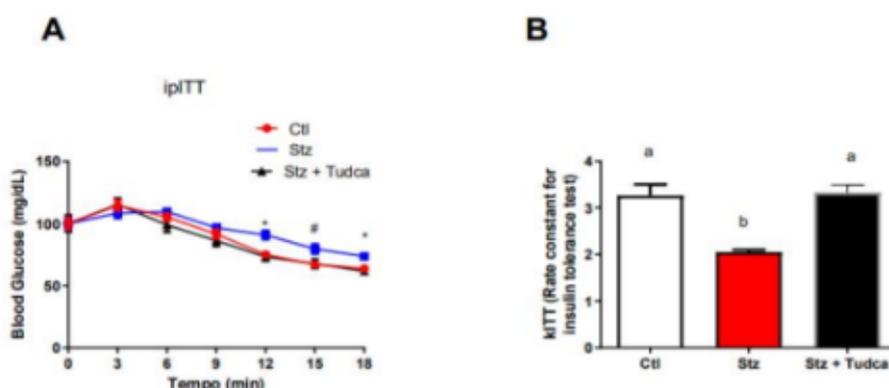


Figura 2: A) Curva glicêmica dos animais no teste de tolerância à insulina. Glicemia plasmática foi verificada nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg de massa). B) Cálculo da velocidade de decaimento da glicose (KITT) no teste de tolerância à insulina. Os resultados acima representam média SEM(n=7-9). Letras diferentes significam diferença estatística ($p > 0.05$). Análise estatística foi realizada por Anova one-way

O tratamento com TUDCA aumentou a concentração plasmática de glucagon

Foi feita a coleta de amostras de sangue em diferentes momentos para avaliar a concentração de glucagon presente no soro dos animais, e foi observado que em todas as situações o grupo STZ mostrou

concentrações plasmáticas iguais às do grupo controle. Porém o grupo que foi tratado com TUDCA apresentou concentrações maiores que os dois grupos descritos anteriormente. Quando comparamos os estados em jejum e alimentado, após a alimentação e após a aplicação de glicose, foi possível identificar que os valores de concentração de glucagon não diminuíram como esperado (Figura 5).

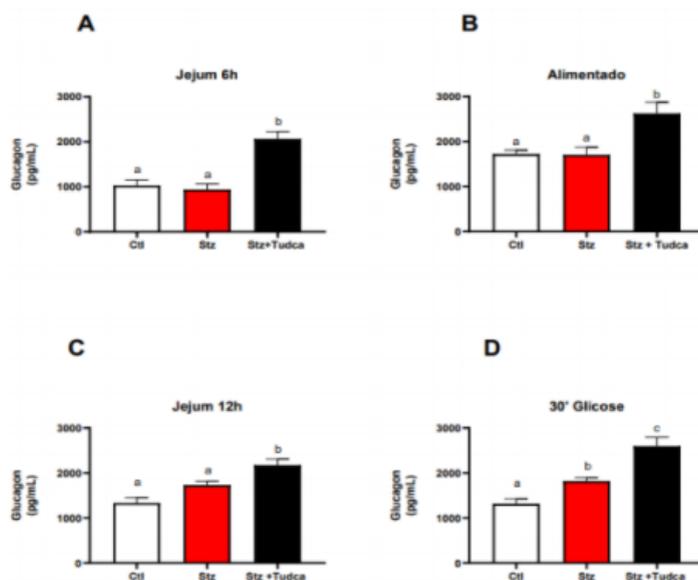


Figura 3: **A)** Concentração de glucagon no soro dos animais após jejum de 6 horas. **B)** concentração de glucagon no soro pós prandial. **C)** Concentração do Glucagon no soro após jejum de 12 horas. **D)** Concentração de glucagon no soro 30 minutos após injeção intraperitoneal de glicose (2 mg/kg corporal). Os resultados acima representam média SEM (n=7-9). Letras diferentes significam diferença estatística (p>0.05). A análise estatística foi realizada por Anova one-way.

O tratamento com TUDCA aumentou a sensibilidade ao glucagon em camundongos modelo Alzheimer

O teste de resistência ao Glucagon foi realizado nos animais modelo Alzheimer para poder entender mais sobre o metabolismo glicêmico, onde foi possível observar menor aumento da glicemia dos animais modelo da DA quando comparado a outros grupos, o que pode indicar prejuízos na sinalização do glucagon nesse animais. Porém os animais modelo da DA tratados com TUDCA apresentaram uma sensibilidade melhor ao glucagon, apresentando glicemia aumentada, semelhante ao grupo controle.

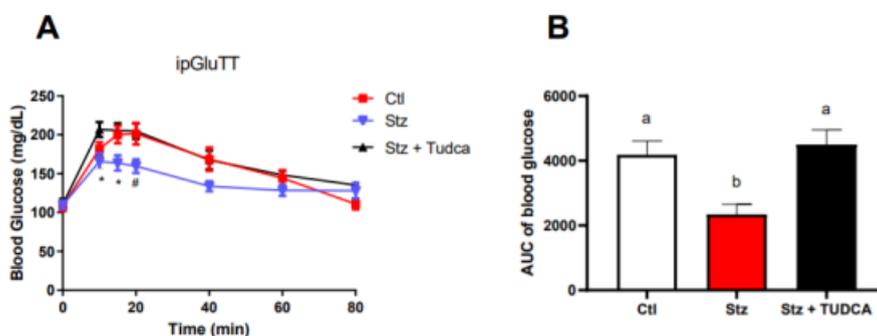


Figura 4: A curva glicêmica dos animais referente ao teste de sensibilidade ao Glucagon. Glicemia verificada nos tempos 0, 10, 15, 20, 40, 60 e 80 minutos após a injeção de glucagon intraperitoneal. B) área sob a curva dos resultados do teste de tolerância ao glucagon.

Os resultados acima representam média SEM(n=7-9). Letras diferentes significam diferença estatística (p>0.05). A análise estatística foi realizada por Anova one-way.

CONCLUSÕES:

Foi possível observar que, nos animais modelo de DA houve modulação na secreção de glucagon, e uma modulação positiva do TUDCA em relação aos efeitos metabólicos da doença de Alzheimer nos camundongos. Assim, é possível que o TUDCA também apresenta efeitos relevantes na homeostase do glucagon na fisiopatologia da DA.

BIBLIOGRAFIA

Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, Cassano T (2015) Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Front Neurosci* 9:204

Malo et al., Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G877-886 (2010).

Takeda S, Sato N, Rakugi H, Morishita R (2011) Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. *Mol Biosyst* 7:1822-1827

Vettorazzi JF, Ribeiro RA, Borck PC, Branco RC, Soriano S, Merino B, Boschero AC, Nadal A, Quesada I, Carneiro EM. The bile acid TUDCA increases glucose-induced insulin secretion via the cAMP/PKA pathway in pancreatic beta cells. *Metabolism*. 2016 Mar;65(3):54-63.. Epub 2015 Oct 17

Vettorazzi, Jean Franscisco. Efeitos do Ácido biliar Tauroursodesoxicólico(TUDCA) na homeostase glicêmica: insulina e glucagon. Tese de doutorado em biologia funcional e molecular- Universidade Estadual de Campinas.

Chen Y, Liang Z, Blanchard J, Dai CL, Sun S, Lee MH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2013) A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTgAD mouse). *Mol Neurobiol* 47:711-725.