

PROPOSTA DE ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EFEITO IONIZANTE DA RADIAÇÃO GAMA DE BAIXA DOSE EM UM MODELO MURINO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Walewska G. Silva¹, Amir Z. Mesquita¹, Leonardo Y. Z. Varella¹, Vitor F. de Almeida¹, Roberta dos S. Ribeiro², Antônio C. P. de Oliveira²

¹Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/Cnen), Campus da UFMG – Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG.

²Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Departamento de Farmacologia, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG.
walewskagouveiasilva@gmail.com

Palavras-Chave: Alzheimer; Estresse oxidativo; Radiação gama; Radiação ionizante

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia multifatorial e neurodegenerativa. É caracterizada pelo acúmulo de proteínas tau e de placas beta amiloide nos neurônios, causando prejuízos na comunicação sináptica e em regiões chave para a regulação da memória e da cognição. Embora seja uma das principais causas da demência no mundo, as terapias existentes para a DA ainda apresentam eficácias questionáveis, o que gera a necessidade de procedimentos mais efetivos, a fim de desenvolver e melhorar os tratamentos disponíveis. Neste sentido, o potencial terapêutico da radiação ionizante de baixa dose vem sendo estudado em modelos *in vitro* e *in vivo* para a DA. Todavia, esse estudo objetiva investigar o efeito ionizante e anti-inflamatório da radiação gama de baixa dose, como forma de tratamento, a fim de compreender melhor os mecanismos da DA, estudando a neurofisiologia envolvida no estímulo cerebral. Para tal, serão utilizados camundongos transgênicos, do tipo APP/PS1. Posteriormente, serão realizados experimentos de dosimetria de baixas doses (30, 50 e 100 mGy), com 30 min de exposição em cada dose única, por um período de 3 meses, no irradiador de fonte cobalto-60, no Laboratório de Irradiação Gama (LIG), do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Em seguida, os camundongos adultos serão observados e avaliados por diferentes períodos, 1, 3, 6 e 8 meses. Para verificar os potenciais efeitos terapêuticos da radiação, serão efetuados testes comportamentais para a avaliação da memória e da cognição do modelo de interesse. Além disso, ensaios de imunofluorescência e imuno-histoquímica também serão performados para a mensuração dos níveis de reatividade glial, viabilidade neuronal e acúmulo de placas beta amiloide em diferentes regiões, como hipocampo e córtex pré-frontal.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população acarreta o aumento do declínio cognitivo e comprometimento funcional, devido à maior incidência demencial. Atualmente, existem várias formas e tipos de demência, que são caracterizadas pelo enfraquecimento cognitivo e/ou comportamental, que interfere nas atividades funcionais do indivíduo. Um desses comprometimentos é a Doença de Alzheimer (DA), que é uma das demências primárias mais frequentes no Brasil. Estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas no mundo serão acometidas com DA em 2050 e, no Brasil, calcula-se que haja uma prevalência de 1,7 milhões de idosos com esse quadro [1].

Essa doença é neurodegenerativa e se caracteriza pelo acúmulo alterado de proteínas, que foram processadas de forma anormal no Sistema Nervoso Central (SNC), afetando o córtex e o hipocampo, devido à progressiva disfunção e morte neural [1, 3]. As mudanças sinápticas ocorrem, inicialmente, no hipocampo, que é uma área suscetível aos danos causados pela DA, por ser uma região profunda do cérebro, que produz oscilações rítmicas substanciais. Essa constatação já foi reportada por meio de um estudo com microeletrodos para medir a atividade elétrica cerebral mediante diferentes frequências de onda. Nesse caso, uma das formas de diagnosticar a presença da DA, mas não é a única, é através de alterações no padrão das oscilações das bandas gama, delta, teta e beta [2].

É por isso que a exploração inicial do hipocampo é importante para diagnosticar e prevenir os primeiros estágios e sinais da DA [2]. Essa patologia apresenta fatores de risco ambientais e de herança genética. Os primeiros são caracterizados pelas formas tardias ou senis da doença, que é causada pelo envelhecimento natural. Somado a isso, outros fatores de risco são a presença de outras doenças, como hipertensão, diabetes *mellitus*, obesidade, sedentarismo, depressão, tabagismo e isolamento social. Já a herança genética, tem relação com as mutações autossômicas dominantes da DA, cuja presença do alelo $\epsilon 4$ do gene da Apolipoproteína E (ApoE) aumenta o risco e antecipa, em alguns casos, o seu início [3].

O processo degenerativo, característico da doença, ocorre devido ao acúmulo de placas beta amiloide ($A\beta$) e de emaranhados neurofibrilares (ENFs) de proteína tau hiperfosforilada, que desencadeiam alterações homeostáticas, responsáveis pelo colapso do citoesqueleto neuronal. Além disso, as mutações no precursor da proteína amiloide, do inglês *amyloid precursor protein* (APP) e da presenilina 1 (PS1) também são associadas à DA em humanos [4]. Os animais transgênicos utilizados em laboratório para investigar essa patologia são conhecidos, portanto, como APP/PS1. A agregação de $A\beta$ e dos ENFs causa neurotoxicidade e potencializa o processo natural inflamatório no organismo, levando ao estresse oxidativo. Como consequência, os sintomas clínicos padrão iniciais são a dificuldade para lembrar de notícias recentes e a repetição de perguntas. Esses sintomas podem progredir e levar à perda de memória, ao prejuízo da linguagem, das funções práxicas, podendo levar à perda da autonomia do paciente [5].

Apesar dos avanços nos estudos para a redução do acúmulo das placas A β e dos ENFs, até o momento, os especialistas afirmam que os mecanismos e as terapias existentes para a DA ainda são questionáveis e pouco eficientes. Isso gera a necessidade de procedimentos mais efetivos, a fim de desenvolver e melhorar os tratamentos disponíveis, cujo foco é aliviar os sintomas, em vez de curar. As terapias anti-amiloidogênicas, por exemplo, apresentam falhas, devido à incapacidade dos medicamentos de atravessar a barreira hematoencefálica. O SNC é tradicionalmente considerado radorresistente, mas crescentes evidências sugerem que baixas doses de radiação apresentam efeitos no cérebro [4]. Neste sentido, o potencial terapêutico da radiação ionizante de baixa dose vem sendo estudado em modelos *in vitro* e *in vivo* para a DA [5].

A radiação consiste na emissão de energia através de ondas eletromagnéticas ou do movimento de partículas subatômicas, originadas de um recurso, como raios X, luz solar e elementos radioativos. A unidade utilizada para a dose é o gray (Gy), que é definido como 1 joule de energia depositado em 1 quilograma de massa. O efeito biológico está relacionado à quantidade de dose absorvida e à intensidade da ionização nas células, causadas por diferentes tipos de radiação [6]. Um dos tipos de radiação é a ionizante, que se apresenta nas formas de onda ou partícula e possui energia suficiente para remover elétrons de um átomo, fazendo com que ele fique carregado ou ionizado [8]. Esse recurso tem benefícios para a indústria e para a sociedade, pois permite a interação com a matéria, possibilitando exames de diagnóstico por imagem e tratamentos de doenças, aumento do tempo de prateleira de alimentos, conservação de itens históricos, dentre outros [6].

Consequente, a utilização de radiação deve seguir protocolos de segurança, que apresentam normas e limites de doses, que variam de acordo com a finalidade do seu propósito. Uma dessas referências é o guia de Requisitos Básicos de Radioproteção e Segurança Radiológica de Fontes de Radiação, que apresenta normas e resoluções da Comissão Nacional de Energia Nuclear. Quando se trata de aspectos da proteção radiológica, 100 mGy é definida como uma baixa dose de radiação. Contudo, quando se fala em uma apuração clínica de doenças degenerativas, as baixas doses são consideradas na faixa entre 0,3 a 2 Gy [7].

Apesar dos benefícios mencionados, também vale ressaltar os seus riscos, que são divididos em duas categorias, os estocásticos, no qual a probabilidade de causar algum efeito aumenta com a dose, e os determinísticos (ou não estocásticos), cujo efeito ocorre acima de uma dose limite. Os primeiros podem apresentar consequências em razão de doses mais altas, devido a períodos longos de exposição, causando mutações genéticas e câncer. Já os segundos, caso o limite não seja alcançado, o resultado não é observado, mas aumenta a partir das doses acima do limiar [9, 10]. Em contrapartida, como a escolha de um tratamento apresenta efeitos benéficos e colaterais adversos, a escolha deve ser favorável e ponderável à saúde, à segurança do paciente e deve estar de acordo com o desfecho almejado. Logo, assumir riscos, desde que sejam menos invasivos e que se apresentem dentro dos protocolos de segurança, consistem em importantes e vastas fontes de investigação [11].

Diante disso, já foi reportado em pesquisas com camundongos transgênicos para a DA (APP/PS1) que baixas doses de radiação ionizante (12 a 20 Gy, em frações de 2 Gy) estimula em torno de 150 genes responsáveis pelo crescimento e resposta oxidativa no cérebro, o que é fundamental para o regresso da neurodegeneração. Em contrapartida, elevadas doses (30 a 60 Gy) apresentam efeitos adversos na cognição e podem provocar efeitos danosos ao facilitar a deposição das A β e dos ENFs [5].

Outro estudo, com a mesma linha de investigação, também sugere que a radiação ionizante craniana, em baixas doses, não prejudica os animais e relata a melhora na aprendizagem espacial e na memória, quando comparado ao grupo controle. Contudo, deixa clara a necessidade de investigar, por mais tempo (além de 8 semanas), os efeitos da neurogênese e da função cognitiva dos modelos animais, para avaliar a durabilidade terapêutica e a necessidade de futuras intervenções [12, 13].

Em uma outra análise, que também estudou o comportamento da radiação gama na DA, em camundongos APP/PS1, foi verificada a reversão da disfunção cognitiva, a redução da carga amiloide, a melhora do metabolismo da glicose e o aumento das enzimas antioxidantes. Apesar da verificação de que a dose única de 4 Gy apresentou características fisiopatológicas melhoradas para a DA, os pesquisadores deste ensaio ressaltam a importância de uma análise de transcriptoma para estudar a expressão gênica do cérebro com DA irradiado. Acredita-se que essa exploração fornecerá uma melhor compreensão das complexas vias de sinalização após a exposição à radiação que, futuramente, pode ser um tratamento não invasivo e econômico para a patologia [6].

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Todo esse estudo experimental com os animais será realizado após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos transgênicos APP/PS1 serão da espécie *Mus musculus* com background C57BL/6J. Eles são adquiridos do Laboratório Jackson, mas os colaboradores do Laboratório de Neurofarmacologia (Neurofar), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG, gentilmente proporcionarão alguns animais dessa linhagem e outros serão adquiridos no Biotério Central da UFMG. Eles serão mantidos em ciclo circadiano no biotério do ICB, ou seja, 12 horas em ambiente claro e 12 horas no ambiente escuro, com livre acesso a água, comida e um objeto para interação. Os camundongos adultos serão observados e avaliados por períodos de 1, 3, 6 e 8 meses, após a irradiação gama.

2.2 Irradiação Gama

Os animais, com 4 meses de vida, serão submetidos à dosimetria de baixas doses (30, 50 e 100 mGy), com 30 min de exposição em cada dose única, por um período de 3 meses, no irradiador de fonte cobalto-60, no Laboratório de Irradiação Gama (LIG), do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

(CDTN). Para evitar a sedação e possíveis interferências, os camundongos estarão imobilizados dentro de um tubo Falcon, que será aberto, para permitir a sua respiração, apenas no momento da passagem da radiação, a fim de evitar ansiedade e estresse. Para minimizar a exposição e tentar colimar o feixe na região cerebral, o tubo em que o animal se encontra será fixado em um suporte de chumbo.

2.4 Estudos e Testes de Comportamento

2.4.1 Campo aberto (*Open Field*)

Para avaliar o comportamento locomotor e exploratório basal dos grupos de interesse, será executado o paradigma experimental do campo aberto (*Open Field* – OF). Para tal, serão utilizadas arenas de acrílico, cilíndricas e circulares, de 40 cm de altura por 30 cm de diâmetro. Os animais serão inseridos individualmente no aparato, sendo permitida a livre exploração deste ambiente por 10 minutos, mensalmente. Durante todo este período, os testes serão gravados por uma *webcam* situada a 2 m do equipamento. Os vídeos serão analisados pelo software *Any-maze Video Tracking System* (version 5.26, Stoelting®), onde serão avaliadas a distância total percorrida pelo animal no aparato, bem como sua velocidade média.

2.4.2 Y maze

A avaliação da memória de curto prazo será realizada por meio do labirinto em Y, um teste baseado na curiosidade inata do roedor para explorar um novo braço do labirinto, ao invés de um explorado recentemente. Para isso, um labirinto em de plástico cinza com três braços (A, B, C) (30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura), dispostos em um ângulo de 60°, e em formato de Y será usado.

Além disso, diferentes pistas visuais serão usadas em cada braço para ajudar os camundongos a se situarem espacialmente. Para o procedimento, os animais serão colocados individualmente na parte distal do braço A, para livre exploração do aparelho por 8 minutos, mensalmente. Adicionalmente, a entrada em um braço será considerada apenas quando ambas as patas traseiras forem colocadas completamente dentro deste. O índice de alternância (%) será calculado usando a seguinte fórmula: $(\text{Número de alternâncias} / [\text{Número total de entradas de braço} - 2]) \times 100$.

2.4.3 Reconhecimento de Objetos

O teste será realizado em uma arena aberta, quadrada e de acrílico (38 x 38 x 15 cm) e se baseia na premissa de que os animais exploram mais um objeto desconhecido do que um familiar. Para a habituação, os animais serão aclimatados à sala e à arena por 2 dias consecutivos antes dos testes (10 min cada habituação). Após esta sessão de aclimação, os animais serão submetidos à etapa de treinamento, que consiste na introdução de dois objetos idênticos por 10 min.

Após 24 h, o animal é devolvido à arena com dois objetos, sendo que um destes será substituído por um objeto novo (NO), onde será permitida a livre exploração do ambiente por 5 minutos, mensalmente. O tempo total de exploração do novo objeto será determinado pela divisão do tempo gasto explorando o novo objeto (NO) pelo tempo total gasto explorando qualquer objeto (NO+CO), resultando na % de exploração do novo objeto.

2.4.4 Labirinto em Cruz Elevado

Será utilizado a fim de avaliar o grau de ansiedade, de exploração e a atividade locomotora. O aparelho é constituído por 4 braços (30 cm de comprimento e 5 cm de largura), sendo dois abertos e dois fechados, que se estendem a partir de uma plataforma central. O número de entradas no braço fechado será considerado uma medida da atividade locomotora.

Os animais serão colocados no centro da plataforma do labirinto e de frente para um braço aberto. Eles serão autorizados a explorar o labirinto por 5 minutos, mensalmente. Durante todo este período, os testes serão gravados por uma *webcam* situada a 2 m do equipamento. Os vídeos serão analisados pelo software *Any-maze Video Tracking System* (version 5.26, Stoelting®), onde serão registrados o número de entradas nos braços abertos e fechados e o total de tempo gasto nas áreas abertas, fechadas e centrais.

2.4.5 *Marble Burying*

Avalia a ansiedade e a obsessão dos animais, devido à interação comportamental com bolinhas de gude. Observa-se a quantidade deixada intacta, as mudanças de posição e quantas foram total ou parcialmente enterradas na maravalha, mensalmente.

2.5 Imunofluorescência e Imuno-histoquímica

Após a perfusão transcardíaca (eutanásia, sob anestesia), os cérebros serão acondicionados *overnight* em paraformaldeído 4% (pH 7,4) antes de serem crioprotégidos com sacarose 30% e congelados em isopentano (P.A). Posteriormente, as fatias de hipocampo de 30 µm serão submetidas ao protocolo de imuno-histoquímica, para a determinação da expressão de NeuN (1:800, EnCor, EUA), sinaptofisina (1:1000, Abcam, EUA), duplacortina (1:1000, Abcam, EUA), Iba-1 (1:500, Wako, Japan) e CD68 (1:500, AbD, USA). Para isso, serão utilizadas amostras inteiras, contendo fatias de todo o eixo ântero-posterior do cérebro.

2.6 Análise Estatística

Os dados serão analisados por Two-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Tukey. O nível de significância será fixado em $p < 0,05$. Os dados serão expressos como média.

3. RESULTADOS (Em andamento)

Esse é um projeto de um estudo experimental para a investigação dos efeitos da radiação gama em um modelo murino para a DA, que está em andamento.

As fases iniciais, e que já foram realizadas, são o constante levantamento de dados na literatura científica, a parceria com o Laboratório de Neurofarmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e as visitas de rotina, para aprender a lidar com as técnicas e com o modelo animal.

4. CONCLUSÃO (Em andamento)

Espera-se que o efeito ionizante e anti-inflamatório da radiação gama de baixa dose ajude a compreender melhor os mecanismos da DA. Também é considerado que o estudo da neurofisiologia envolvida no estímulo cerebral reduza as características fisiopatológicas da doença, como reversão ou redução da disfunção cognitiva, melhora no metabolismo da carga amiloide e diminuição da formação dos ENFs.

Como a radiação é um procedimento não invasivo e tem se apresentado como uma técnica promissora no tratamento de condições neurodegenerativas, a seguinte proposta possui uma natureza de vanguarda para o desenvolvimento de terapias do gênero, a serem desenvolvidas em um escopo nacional. O Brasil apresenta pesquisas sob perspectiva quando se trata de patologias do SNC e, a longo prazo, as evidências obtidas neste estudo podem auxiliar em alternativas terapêuticas para a DA, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da sociedade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelas seguintes instituições: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), Comissão Nacional de Energia Nuclear (Cnen) para bolsa de pós-doutorado Edital Cnen 05/2021, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 308628/2022-5).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] J. Smid *et al.*, Declínio Cognitivo Subjetivo, Comprometimento Cognitivo Leve e Demência – Diagnóstico Sindrômico: Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia, *Dement Neuropsychol*, 16 (3 Suppl. 1), pp. 1-17, Setembro (2022). DOI: [10.1590/1980-5764-DN-2022-S101PT](https://doi.org/10.1590/1980-5764-DN-2022-S101PT).

[2] W. Yuan *et al.*, Neural Oscillation Disorder in the Hippocampal CA1 Region of Different Alzheimer's Disease Mice, *Current Alzheimer Research*, Bentham

Science, 20, 350-359, 1875-5828, China (2023). DOI: [10.2174/1567205020666230808122643](https://doi.org/10.2174/1567205020666230808122643).

[3] S. Andrade *et al.*, Transferrin-functionalized liposomes loaded with vitamin VB12 for Alzheimer's Disease Therapy, International Journal of Pharmaceutics, 626, 122167, 0378-5173, Portugal (2022). DOI: [10.1016/j.ijpharm.2022.122167](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122167).

[4] M. K. Schroeder *et al.*, Long-Term Sex-and Genotype-Specific Effects of ⁵⁶Fe Irradiation on Wild-Type and APP^{swe}/PS1^{dE9} Transgenic Mice, International Journal of Molecular Sciences, MDPI, 22, 13305 (2021). DOI: [10.3390/ijms222413305](https://doi.org/10.3390/ijms222413305).

[5] L. P. Schilling *et al.*, Diagnóstico da Doença de Alzheimer: Recomendações do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia, Dement Neuropsychol, 16 (3 Suppl. 1), pp. 25-39, Setembro (2022). DOI: [10.1590/1980-5764-DN-2022-S102PT](https://doi.org/10.1590/1980-5764-DN-2022-S102PT).

[6] M. Khandelwal *et al.*, Gamma Radiation Improves AD Pathogenesis in APP/PS1 Mouse Model by Potentiating Insulin Sensitivity, Heliyon 6, CellPress, 2405-8440, India (2020). DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e04499](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04499).

[7] <https://www.who.int/> acessado em 21/07/2024.

[8] CNEN, Requisitos Básicos de Radioproteção e Segurança Radiológica de Fontes de Radiação, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, Brasil (2024).

[9] A. Z. Mesquita, Energia Nuclear: Uma Introdução, ISBN: 9788584802210. 1. ed. Curitiba (PR): Editora UFPR, Universidade Federal do Paraná, v. 1, 249p, Brasil (2023).

[10] C. P. Farinas, How to Fight the Fear Under the X-Ray Beam, Interventional Neuroradiology Fellow Mom to Be, InterSEXT, Pregnancy in Interventional Neuroradiology Career, American Heart Association, Canada (2020). DOI: [10.1161/STROKEAHA.120.029655](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029655).

[11] C. T. Vu; D. H. Elder, Pregnancy and the Working Interventional Radiologist, Seminars in Interventional Radiology, v. 30, ISSN 0739-9529, USA (2013). DOI: [10.1055/s-0033-1359735](https://doi.org/10.1055/s-0033-1359735).

[12] R. E. Hendrick, Radiation Doses and Risks in Breast Screening, Science of Screening, Oxford, University of Colorado School of Medicine, Department of Radiology, Society of Breast Imaging, Reino Unido (2020). DOI: [10.1093/jbi/wbaa016](https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa016).

[13] B. Marples *et al.*, Cranial Irradiation Significantly Reduces Beta Amyloid Plaques in the Brain and Improves Cognition in a Murine Model of Alzheimer's Disease (AD), Radiotherapy and Oncology, 0167-8140, USA (2015). DOI: [10.1016/j.radonc.2015.10.019](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.10.019).