

## **TRATAMENTO COM EXTRATO DE MIRTILO PREVINE ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS NTPDase e ADENOSINA DEAMINASE EM LINFÓCITOS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE MANIA**

JÉSSICA PUREZA<sup>1</sup>; GABRIELA DEBOM<sup>2</sup>; CARLUS AUGUSTU DO COUTO<sup>3</sup>;  
CLAITON LENCINA<sup>4</sup>; MARTA GAZAL<sup>5</sup>; ROSELIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – *jessica\_pureza@hotmail.com*

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – *gabriela.debom@gmail.com*

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – *carlusatc@gmail.com*

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – *claiton.ufpel@gmail.com*

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – *martagazal@hotmail.com*

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – *rspanevello@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

O transtorno de humor bipolar (THB) é caracterizado por alterações de humor, onde o paciente manifesta episódios depressivos alternando-se com episódios de mania, em diversos graus de intensidade. As causas do THB são ainda desconhecidas, mas provavelmente envolve um conjunto de fatores genéticos e ambientais que interagem durante o neurodesenvolvimento para determinar a vulnerabilidade à doença (LEBOYER et al., 2005).

Pacientes bipolares apresentam um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), além de alterações nas funções de células imunes (KIM et al., 2007). Esses dados sugerem que mecanismos imunes e inflamatórios podem estar relacionados com a neurobiologia e progressão dos THB.

É bem estabelecido na literatura que o ATP extracelular possui ações pró - inflamatórias enquanto que a adenosina possui atividades anti-inflamatórias. A enzima NTPDase é capaz de hidrolisar ATP e ADP formando AMP, o qual é posteriormente hidrolisado gerando adenosina. A adenosina formada é degradada pela ação da ADA. Essas enzimas desempenham papéis cruciais nas respostas imunes e inflamatórias por controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina e a sinalização por eles induzida (BOURS et al., 2006).

O tratamento clássico do THB é a administração de carbonato de lítio, que possui um efeito antimaníaco e profilático contra a recorrência dos episódios, porém possui uma janela terapêutica estreita e causa muitos efeitos colaterais (NASSAR et al., 2014). Desta forma, na tentativa de encontrar novas terapias os derivados de plantas vêm sendo estudados, como o mirtilo (*Vaccinium* sp.) que é uma fruta que possui várias propriedades terapêuticas importantes como ação antioxidante e anti-inflamatória (TORRI et al., 2007).

Sendo assim, considerando que os transtornos de humor apresentam um forte impacto na qualidade de vida dos pacientes, o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desses transtornos tornam-se relevantes. Sendo assim, o objetivo do trabalho é avaliar o efeito do extrato de mirtilo sobre a atividade das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos de ratos submetidos ao modelo experimental de mania.

### **2. METODOLOGIA**

#### **2.1 Preparação do extrato**

Os frutos de mirtilo (*Vaccinium virgatum* Aiton), foram coletados em área cultivada pelo Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia na UFPel, Pelotas/RS, Brasil (31°48'08"S e 52°25'06"W). Após a coleta, os frutos foram acondicionados sob refrigeração a - 20°C e ao abrigo da luz até sua utilização. Assim, 30 g de frutos congelados foram sonicados com 90 mL de etanol 70° acidificado (pH 1,0) por 30 min. Os extratos foram filtrados, neutralizados e evaporados até secar e posteriormente utilizados no estudo.

## 2.2 Animais

Foram utilizados 60 ratos adultos *Wistar* (200-280g, 60 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram mantidos em condições experimentais controladas (24-27°C), água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 h) durante todo o período de tratamento. Neste estudo, todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFPel (CEEA: 9026).

## 2.3 Modelo animal de mania e protocolo de prevenção com extrato de mirtilo

Os animais foram divididos em seis grupos (n=10 cada grupo): I (salina); II (extrato de mirtilo 200 mg/kg), III (carbonato de lítio 45 mg/kg), IV (cetamina 25mg/kg); V (cetamina 25 mg/kg + extrato de mirtilo 200 mg/kg) e grupo VI (cetamina 25 mg/kg + carbonato de lítio 45 mg/kg). O tratamento teve duração de 15 dias sendo que nos primeiros sete dias os animais dos grupos II e V receberam por via oral extrato de mirtilo (200mg/kg), os animais dos grupos III e VI receberam 45 mg/kg de carbonato de lítio (duas vezes ao dia) por via oral enquanto que os animais dos grupos I e IV receberam solução salina. Entre os dias 8<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia os animais dos grupos IV, V e VI receberam também, cetamina (25 mg/kg) enquanto que os animais dos grupos I, II e III receberam solução salina 0,9% por via intraperitoneal. No 15<sup>o</sup> dia os animais receberam uma única dose de cetamina e após 30 minutos a atividade locomotora foi avaliada utilizando o teste de campo aberto.

## 2.4 Determinação da atividade da NTPDase e Adenosina deaminase

Após o teste de campo aberto os animais foram submetidos à eutanásia e o sangue foi coletado. Os linfócitos foram separados sob um gradiente de densidade usando Ficoll. A atividade da NTPDase em linfócitos foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico liberado na reação segundo o método de LEAL et al., (2005) e a atividade da ADA pelo método de GIUSTI e GAKIS (1971).

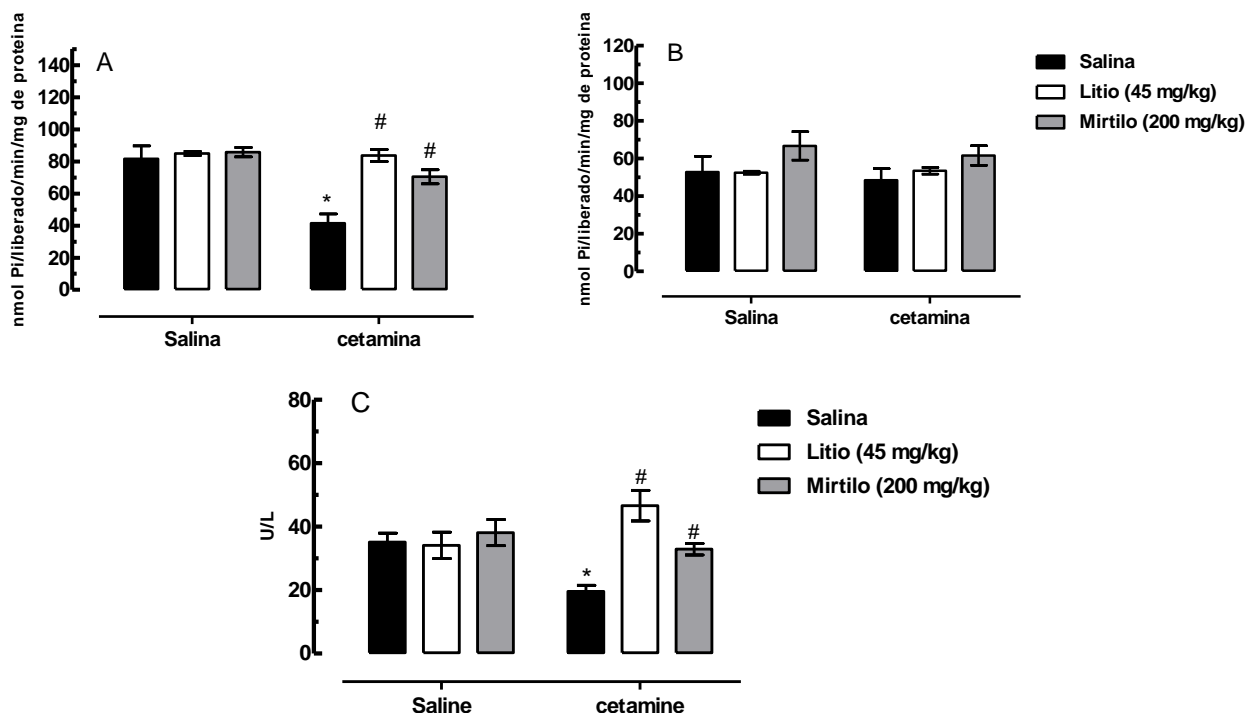
## 2.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (two-way ANOVA), seguida do teste de *post-hoc* de Bonferroni. Os resultados foram considerados significantes quando  $P \leq 0.05$  e expressos como média  $\pm$  erro padrão.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a atividade da NTPDase, usando ATP como substrato, foi diminuída em linfócitos de ratos tratados somente com cetamina (grupo IV,  $P < 0.05$ ) e o tratamento com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio foram capazes de prevenir esta alteração (Figura 1A). Não foram observadas alterações na atividade da NTPDase em nenhum dos grupos avaliados quando o

ADP foi usado como substrato (Figura 1B). A atividade da ADA foi diminuída em linfócitos de ratos tratados somente com cetamina (grupo IV,  $P < 0.05$ ) e o tratamento com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio também foram capazes de prevenir a inibição da atividade da ADA em linfócitos neste modelo experimental de mania (Figura 1C).



**Figura 1:** Efeito do extrato de mirtilo e de carbonato de lítio na atividade da NTPDase, usando ATP (A) e ADP (B) como substrato, e na atividade da ADA (C) em linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de mania induzida por cetamina. \*Diferente do grupo controle/salina para  $P < 0.05$ . # Diferente do grupo cetamina/salina para  $P < 0.05$ .

A cetamina é um fármaco antagonista não competitivo de receptores NMDA, usada como anestésico, entretanto quando administrada em doses específicas pode ocasionar episódios maníacos (GHEDIM et al., 2012). A validação do modelo de mania usado no estudo é feita pelo teste do campo aberto. A administração de cetamina induz hiperlocomoção nos animais sendo esse parâmetro um indicativo de episódio maníaco (GAZAL et al., 2014). Sendo assim, é importante destacar que os tratamentos com extrato de mirtilo ou carbonato de lítio foram capazes de prevenir a hiperlocomoção dos animais tratados com cetamina.

Uma diminuição na atividade da NTPDase em linfócitos poderia levar a um aumento nos níveis de ATP extracelular, uma molécula com ações pró-inflamatórias (BOURS et al., 2006). Por outro lado uma diminuição da atividade da ADA poderia aumentar os níveis de adenosina, uma molécula com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. Desta forma, pode-se propor que essa alteração na atividade da ADA pode ser um mecanismo compensatório para diminuir a resposta inflamatória e imune contribuindo assim para a integridade tecidual nos episódios maníacos.

O tratamento com extrato de mirtilo foi capaz de prevenir as alterações nas enzimas de linfócitos de forma similar ao carbonato de lítio, um fármaco utilizado no tratamento dos THB. O mirtilo contém vários tipos de antocianinas, sendo

assim, estima-se que os efeitos benéficos descritos para o mirtilo tenham relação com a presença desses compostos.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato de mirtilo foi capaz de prevenir as alterações na atividade das enzimas NTPDase e ADA em linfócitos em um modelo experimental de mania, sugerindo assim que este fruto pode ser benéfico no tratamento de transtornos de humor. Entretanto mais estudos precisam ser realizados para avaliar os mecanismos envolvidos nesses efeitos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

##### Artigos:

BOURS, M.; SWENNEN, E.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.; DAGNELIE, P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics** 112: 358-404, 2006.

GAZAL, M.; VALENTE, M.R.; ACOSTA, B.A.; KAUFMANN, F.N.; BRAGANHOL, E.; LENCINA, C.L.; STEFANELLO, F.M.; GHISLENI, G.; KASTER, M.P. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. **European Journal of Pharmacology** 724, p. 132-139, 2014.

GHEDIM, F.; FRAGA, D.; DEROZA, P.; OLIVEIRA, M.; VALVASSORI, S.; STECKERT, A.; BUDNI, J.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; ZUGNO, A.I. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: Implications as an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research** 46, p. 1569-1575, 2012.

GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme** 1971, 12:417-425.

KIM K., JUNG, H., MYINT, A., KIM, H.; PARK SH. Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders** 104: 91-95, 2007.

LEAL, D.; STREHER, C.; NEU, T.; BITTENCOURT, F.; LEAL, C.; SILVA, J.; MORSCH, V.M.; SCHERINGER, M.R.C. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica Biophysica Acta** 2005, 1721: 9-11.

LEBOYER, M; HENRY, C., Pallere-Martinot M., Bellivier, F. Age and onset in bipolar affective disorders: a review. **Bipolar Disorders** 7: 11-118, 2005.

NASSAR, N.; AZAB, A. Effects of Lithium on Inflammation. **ACS Chemical Neuroscience**, 5, 451-458, 2014.

TORRI, E.; LEMOS, M.; CALIARI, V.; KASSUYA, C.; BASTOS, J.; ANDRADE, S. Anti inflammatory and antinociceptive properties of blueberry extract (*Vaccinium corymbosum*). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2007, 59: 591-596; 2007.