

## **ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE MANIA APÓS TRATAMENTO COM LÍLIO.**

JULIANE DA SILVA PORTO<sup>1a</sup>; GABRIELA DeBOM NOGUEIRA<sup>1b</sup>; MAYARA SOARES<sup>1</sup>; MARTA DE OLIVEIRA GAZAL<sup>1</sup>; ROSÉLIA MARIA SPANEVELLO<sup>1</sup>; GIANA DE PAULA COGNATO<sup>1c</sup>

*1- Universidade Federal de Pelotas*

a- ju\_port\_to@hotmail.com

b- gabriela.debom@gmail.com

c- giana.cognato@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O transtorno de humor bipolar (THB) se caracteriza por alterações de humor que se manifestam como episódios depressivos (redução do humor, energia e da atividade) e por episódios de mania (caracterizada pela elevação do humor e aumento da energia e da atividade). A prevalência deste transtorno chega a 9% da população mundial, entre os dois tipos já classificados (Tipo I e II). Além disso, o THB pode ocorrer junto com transtornos de ansiedade e com abuso e dependência de substâncias, além dos pacientes apresentarem um alto índice de suicídios (15 a 20%) (OLIVEIRA, et al, 2015). O diagnóstico do THB é essencialmente clínico, feito através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição (DSM-V). Este pode ser complexo e mascarado por comorbidades e problemas de personalidade, resultando em atrasos entre a primeira apresentação e o início da terapia adequada. O diagnóstico preciso é essencial para o tratamento eficaz, pois a terapia inadequada desestabiliza o curso e o desfecho clínico da doença (BERK, et al, 2006).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor bastante difundido por todo o sistema nervoso central (SNC), incluindo as regiões do córtex cerebral, prosencéfalo basal, hipocampo, diencefalo, ponte e, em menor quantidade, no cerebelo. Os neurônios colinérgicos estão relacionados com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória, e todas essas ações exercidas pela ACh estão prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor (VINUTHA, et al., 2007).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso e inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando-o em acetato e colina. A ACh é sintetizada e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico e a sua liberação depende da alteração iônica e elétrica da membrana plasmática promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  seguida da fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática, promovendo a liberação e difusão de ACh até o receptor localizado na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. Antes de ocorrer a nova liberação de ACh, a molécula previamente liberada deve ser hidrolisada pela AChE (MOTA, et al., 2012). Atualmente, existem dados na literatura que demonstram um envolvimento da atividade da AChE em modelos animais de mania (VARELA et al., 2013; Van ENKHUIZEN et al., 2015). Além disso, evidências apontam para o fato de que a transmissão colinérgica também pode ser afetada por um fármaco de extenso uso no tratamento de THB: o Lítio (Petraglio et al., 2008).

Atualmente, um dos modelos animais utilizados para o estudo de THB é o modelo de mania induzido por cetamina, uma arilcicloalquilamina derivada da fenciclidina (LUFT e MENDES, 2005). Esses isômeros possuem propriedades farmacológicas diferentes. A ação neurofarmacológica da cetamina possui alto grau de complexidade, visto que apresenta interação com diversos receptores em diferentes sítios de ligação, tais como os receptores glutamatérgicos, tanto NMDA (N-metil-Daspartato) quanto não-NMDA; opióides; gabaérgicos; serotoninérgicos; além de agir, direta ou indiretamente, sobre as monoaminas (acetilcolina, noradrenalina e dopamina). Além disso, os efeitos adversos comportamentais descritos após tratamento com cetamina podem estar relacionados à alteração da transmissão colinérgica (ZUGNO et al., 2014).

Portanto, considerando que (1) a cetamina vem sendo utilizada para desenvolvimento de modelo de mania em roedores, (2) o Lítio poderia alterar a atividade da AChE e, finalmente, (3) existem evidências de que a transmissão colinérgica possa estar envolvida na patofisiologia do THB, o presente estudo tem por objetivo analisar a atividade da enzima AChE em um modelo experimental de mania induzido por cetamina após tratamento com Lítio.

## 2. METODOLOGIA

**2.1. Animais:** Foram utilizados 24 ratos adultos Wistar (com peso 250-300g e com 60 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Os animais foram colocados em gaiolas padrão (04 animais por gaiola) em condições experimentais controladas (24-27°C), com água e comida *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h durante todo o período de tratamento. O protocolo experimental desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEAA 9026).

**2.2 Modelo animal de mania e tratamento com Lítio:** O protocolo a ser utilizado neste estudo foi previamente proposto por GHEDIM e colaboradores (2012) e teve duração de duas semanas. Em um primeiro momento, os animais foram submetidos a um tratamento de 14 dias com lítio (45 mg/kg) e ou veículo (Salina 0,9%) através de gavagens diárias (dias 1 a 14). Para realizar o modelo de mania, foi administrada cetamina (25 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) dos dias 8 à 14. Portanto, os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte maneira (n=6 cada grupo): I - Salina/Salina; II - Lítio/Salina; III - Salina/Cetamina; IV - Lítio/Cetamina. No 15º dia os animais receberam uma única dose de cetamina e após avaliação comportamental, amostras biológicas de córtex cerebral, hipocampo e estriado foram coletadas para determinação da atividade da AChE.

**2.3 Amostras Biológicas:** Os animais foram submetidos à eutanásia imediatamente após o teste comportamental. Desses animais foi coletado o encéfalo, que posteriormente foi dissecado em córtex cerebral estriado e hipocampo. Essas estruturas foram imediatamente homogeneizadas e sua proteína foi determinada utilizando albumina bovina como padrão através do reagente de cor Coomassie Blue (Bradford, 1976).

**2.4. Determinação da atividade da AChE:** A atividade da AChE foi determinada de acordo com Ellmann e colaboradores (1961). Este método baseia-se na hidrólise do substrato acetiltiocolina formando acetato e tiocolina. O produto tiocolina reage com DTNB formando o ânion amarelo 5-tio 2 nitrobenzoico que absorve luz em 412nm. Os resultados foram expressos em U/L.

**2.5. Análise estatística:** Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido por teste post-hoc de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise das atividades enzimáticas, pode-se observar que em amostras de córtex cerebral os animais submetidos ao tratamento apenas com cetamina tiveram a atividade da AChE diminuída ( $2.108 \pm 0.2584$  U/L) quando comparada ao grupo controle ( $3.831 \pm 0.1804$   $\mu$ mol de tiocolina/hora/mg de proteína), entretanto essa diferença não foi significativa. Em hipocampo e estriado, essa alteração na atividade da AChE não foi observada. Um estudo publicado em 2014, também analisou a atividade da AChE nas mesmas estruturas cerebrais após o tratamento com cetamina. Nesse estudo, os autores observaram um aumento da atividade enzimática após 1, 3 e 6 horas da última exposição de cetamina (Zugno et al., 2014). A discrepância entre os dados da literatura e os dados apresentados neste resumo podem ter ocorrido devido à diferença nos tempos de análise da atividade da AChE após a última injeção de cetamina, uma vez que as estruturas cerebrais utilizadas em nosso estudo foram coletadas 35 minutos após a última exposição à cetamina. Além disso, existem evidências que o aumento da transmissão colinérgica poderia estar envolvida na patofisiologia do THB (Van Enkhuizen et al., 2015), o que poderia estar relacionado com a inibição da AChE.

Além dos resultados supracitados, o tratamento com lítio foi capaz de aumentar a atividade da AChE significativamente em estriado de animais posteriormente tratados com salina ou cetamina. Esse efeito gerado pelo tratamento com lítio sobre a atividade da AChE não foi observado no córtex cerebral ou no hipocampo. Evidências da literatura sugerem que o Lítio pode interagir com o sítio ativo de uma AChE recombinante e aumentar sua velocidade de hidrólise ( $V_{\text{máx}}$ ) e sua afinidade pelo substrato ( $K_M$ ) (Petraglio et al., 2008). Esses dados corroboram com os resultados obtidos com amostras de estriado, mas não com hipocampo e córtex pré-frontal. Dados da literatura já demonstraram a caracterização de diferentes isoformas de AChE expressas em distintas regiões cerebrais (Zimmermann, 2013). Levando essa evidência em consideração, a isoforma de AChE presente na região estriatal poderia ser distinta das isoformas expressas em hipocampo e córtex pré-frontal, uma vez que responde de forma diferente ao tratamento com o Lítio.

### 4. CONCLUSÕES

Nossos achados contribuem para uma melhor caracterização da atividade da AChE em diferentes regiões cerebrais de ratos submetidos ao modelo de mania induzido por cetamina. Além disso, as diferentes respostas ao tratamento com Lítio sugerem a possibilidade de que diferentes isoformas de AChE podem ser expressas em distintas regiões cerebrais. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com o intuito de esclarecer essa questão.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Psychiatric Association: **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais – DSM V**. Artmed 2014, p. 123-139.
- Associação Brasileira de Transtorno Bipolar. **O que é transtorno bipolar**. Acessado em 21 de Julho de 2015. Online. Disponível em: <http://www.abtb.org.br/transtorno.php>
- BERK, M; BERK, L; DODD, S; MALHI, GS. Diagnosing bipolar disorder: how can we do it better? **The Medical Journal of Australia**, v. 184, n. 9, p. 459-62, 2006.

- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- ELLMAN, GL; COURTNEY, KD; ANDRES, V; Jr, FEATHER-STONE RM. new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-90, 1961.
- GHEDIM, FV; FRAGA, DB; DEROZA, PF; OLIVEIRA, MB; VALVASSORI, SS; STECKERT, AV; BUDNI, J; Dal-PIZZOL, F; QUEVEDO, J; ZUGNO, AI. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n.12, p. 1569-1575, 2012.
- LUFT, A; MENDES, FF. (+) Cetamina em Baixas Doses: Atualização \* Low S(+) Ketamine Doses: A Review. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, p. 460-469, 2005.
- MOTA, WM; BARROS, ML; CUNHA, PEL; SANTANA MVA; STEVAM CS; LEOPOLDO PTG. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 12, p. 624-628, 2012.
- OLIVEIRA, IR; SCHWARTZ, T; STAHL, SM. **Integrando psicoterapia e psicofarmacologia: Manual para clínicos**. Artmed, 2015; p. 89-98.
- PETRAGLIO, G; BARTOLINI, M; BRANDUARDI, D; ANDRISANO, V; RECANATINI, M; GERVASIO, FL; CAVALLI, A; PARRINELLO, M. The role of Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> in the ligand binding inside the human acetylcholinesterase gorge. **Proteins**, v. 70, n. 3, p. 779-785, 2008.
- Van ENKHUIZEN J; MILIENNE-PETIOT, M; GEYER, MA; YOUNG, JW. Modeling bipolar disorder in mice by increasing acetylcholine or dopamine: chronic lithium treats most, but not all features. **Psychopharmacology**, (a head of print), 2015.
- VARELA, RB; VALVASSORI, SS; LOPES-BORGES, J; FRAGA, DB; RESENDE, WR; ARENT, CO; ZUGNO, AI; QUEVEDO, J. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of mania induced by D-amphetamine. **Psychiatry Research**, v. 209, n. 2, p. 229-34, 2013.
- VINUTHA, B; PRASHANTH, D; SALMA, K; SREEJA, SL; PRATITI, D; PADMAJA, R; RADHIKA, S; AMIT, A; VENKATESHWARLU, K; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p. 359-63, 2007.
- ZIMMERMANN M. Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors? **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 5, p. 953-67, 2013.
- ZUGNO, AI; MATOS, MP; CANEVER, L; FRAGA, DB; De LUCA, RD; GHEDIM, FV; DEROZA, PF; De OLIVEIRA, MB; PACHECO, FD; VALVASSORI, SS; VOLPATO, AM; BUDNI, J; QUEVEDO, J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. **Acta Neuropsychiatrica**, p. 43-50, 2014.