

## EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA À METIONINA E/OU METIONINA SULFÓXIDO ALTERA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS

MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES<sup>1</sup>, BRUNA MATTOS<sup>2</sup>, SIMONE PACHECO<sup>3</sup>, MARIANA GERZSON<sup>4</sup>, FRANCIELI STEFANELLO<sup>5</sup>, ROSELIA SPANEVELLO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - mayara\_sandrielly@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – brunamtt@gmail.com

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

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – mgerzson@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - fmstefanello@gmail.com

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

### 1. INTRODUÇÃO

A metionina adenosiltransferase (MAT) é uma enzima chave na síntese de S-adenosilmetionina (SAM), principal doador de grupo metila. A deficiência da MAT é caracterizada pela hipermetioninemia tecidual e plasmática isolada e persistente (FORUJO et al., 2012). A metionina sulfóxido (MetO) é um metabólito, com potencial tóxico produzido nas rotas alternativas da metionina (Met), o qual também encontra-se elevado na hipermetioninemia (MOSKOVITZ, 2014). Pacientes hipermetioninêmicos podem manifestar disfunções neurológicas como déficit cognitivo, edema, retardo no desenvolvimento psicomotor e dismorfismo facial principalmente associadas à desmielinização atribuído à deficiência de SAM no fluido cérebro espinhal (SURTEES et al., 1991).

A sinalização colinérgica é mediada pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh) e está envolvida em uma variedade de funções biológicas, como no processo de aprendizagem, memória e em outros aspectos de cognição. A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da ACh regulando assim a transmissão colinérgica (DREVER et al., 2011). Desse modo, a AChE é considerada um importante marcador de alterações neurológicas. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que elevados níveis de Met causam um aumento na atividade da AChE em cérebro de ratos jovens. Entretanto, ainda pouco se sabe da relação da hipermetioninemia, especialmente os efeitos da MetO, sobre a atividade da AChE e os sintomas neuropsicológicos presentes nessa doença.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da administração aguda e crônica da Met e/ou MetO sobre parâmetros comportamentais e na atividade da enzima AChE em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* obtidos do Biotério Central da UFPel, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura (20-24°C) e umidade (40-60%) controladas, água e alimento *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 3527).

## *2.2 Modelo experimental agudo de hipermetioninemia*

Neste experimento foram utilizados 40 ratos Wistar (29 dias) os quais receberam uma única injeção subcutânea e foram divididos nos seguintes grupos: Salina (controle), Met (Met 0,4 g/Kg), MetO (MetO 0,1 g/Kg) e/ou associação destes (Met 0,4 g/Kg + MetO 0,1 g/Kg) e foram submetidos a eutanásia 1 e 3 h após a administração. O encéfalo foi coletado e dissecado para a obtenção das estruturas cerebrais.

## *2.3 Modelo experimental crônico de hipermetioninemia*

No tratamento crônico, os animais foram divididos em quatro grupos (n=7): solução salina (controle), Met (0,2-0,4 g/Kg), MetO (0,05-0,1 g/kg) e a associação destes (Met+MetO). Os animais foram tratados diariamente recebendo duas injeções subcutâneas com intervalo de 8 h entre as injeções, do 6º ao 28º dia de vida. As doses utilizadas e o tempo de tratamento foram baseados em trabalhos da literatura (STEFANELLO et al. 2007). Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a três testes comportamentais. O teste do campo aberto para avaliar a atividade locomotora dos animais, o teste do labirinto em Y que consiste em avaliar a capacidade de memória espacial dos animais. O teste de reconhecimento de objetos o qual foi realizado para acessar memória declarativa, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Após 12 h da última injeção, os animais foram submetidos à eutanásia e o encéfalo foi coletado e dissecado para a obtenção das estruturas cerebrais.

## *2.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase*

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em Tris HCl 10 mM e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade da AChE segundo o método de Ellmann et al., (1961) sendo a atividade expressa em  $\mu\text{mol AcSch/h/mg}$  de proteína.

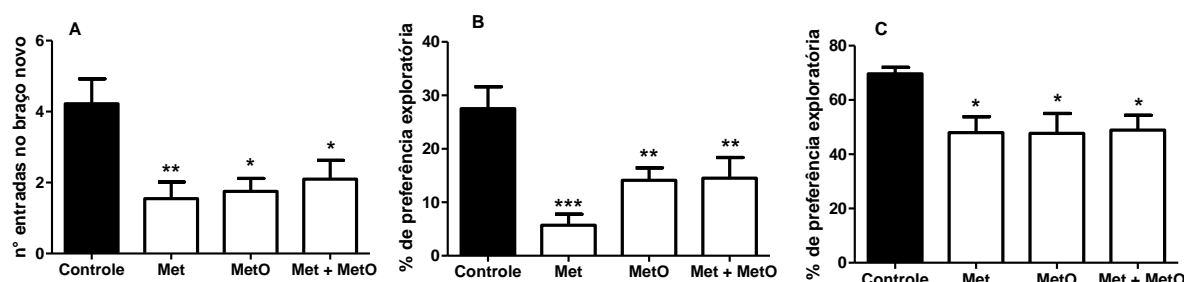
## *2.5 Análise estatística*

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão.

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados demonstraram que não houve alteração da atividade locomotora no campo aberto em nenhum dos grupos experimentais. Em relação ao teste do labirinto em Y, foi possível observar que tanto o número de entradas quanto o percentual de tempo gasto na exploração do braço novo foi menor nos grupos Met, MetO e Met+MetO, mostrando que altas concentrações desses aminoácidos alteram a memória espacial desses animais (Figura 1). Além disso, foi possível observar que os animais dos grupos Met, MetO e Met+MetO apresentaram um desempenho exploratório diminuído na tarefa do reconhecimento de objetos, explorando menos o objeto novo, o que permite inferir

que os tratamentos são capazes de causar prejuízo na memória nos animais (Figura 1).



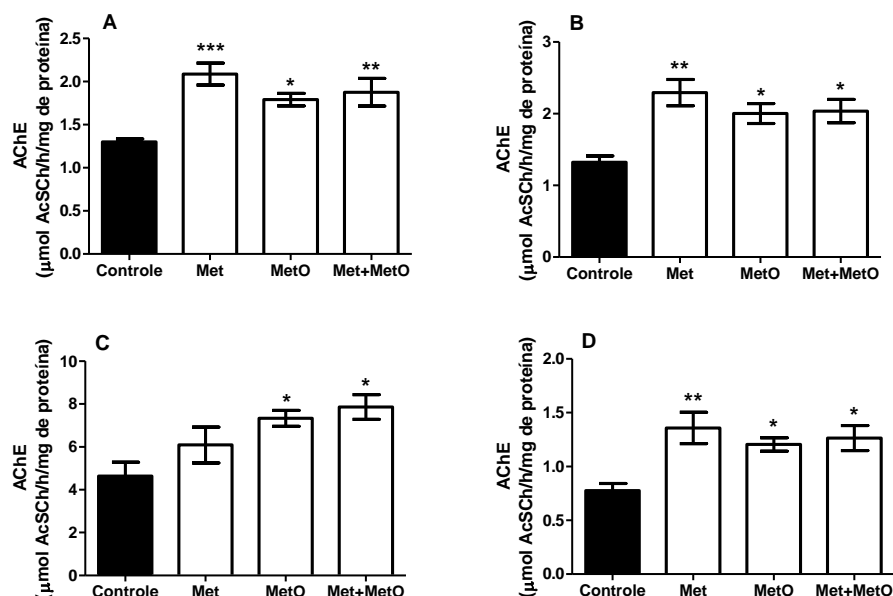
**Figura 1:** Efeitos da administração crônica por 21 dias de metionina (Met), metionina sulfóxido (MetO) e associação de metionina e metionina sulfóxido (Met+MetO) nos teste de labirinto em Y (A e B) e reconhecimento de objetos (C) em ratos jovens. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  comparado com o grupo controle.

A atividade da AChE foi maior nos grupos MetO e Met+MetO em córtex cerebral, estriado e cerebelo após 1 h de tratamento. Por outro lado, houve uma redução da atividade da AChE em hipocampo nos grupos MetO e Met+MetO. Após 3h da administração dos aminoácidos, foi possível observar um aumento da atividade da AChE em córtex cerebral nos grupos MetO e Met+MetO e no estriado em todos os grupos experimentais. Não foram observadas alterações em cerebelo em nenhum dos grupos experimentais após 3h. Com relação à atividade da AChE em hipocampo houve uma redução nos grupos MetO e Met+MetO (Tabela 1)

**Tabela 1:** Atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos jovens após 1 h e 3 h da administração de metionina (Met), metionina sulfóxido (MetO) e associação de metionina e metionina sulfóxido (Met+MetO). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  comparado com o controle.

	AChE ( $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ de proteína)				AChE ( $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ de proteína)			
	1h				3h			
	Córtex Cerebral	Hipocampo	Estriado	Cerebelo	Córtex cerebral	Hipocampo	Estriado	Cerebelo
Controle	2.3 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.06
Met	3.4 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.5***	1.7 $\pm$ 0.08
MetO	3.6 $\pm$ 0.4*	2.9 $\pm$ 0.1**	12.7 $\pm$ 0.9***	2.3 $\pm$ 0.1***	5.1 $\pm$ 0.1***	2.4 $\pm$ 0.2*	9.4 $\pm$ 0.2***	1.6 $\pm$ 0.05
Met+MetO	3.8 $\pm$ 0.1*	2.9 $\pm$ 0.3**	9.5 $\pm$ 0.5*	2.0 $\pm$ 0.1*	4.2 $\pm$ 0.3**	2.4 $\pm$ 0.1*	8.3 $\pm$ 0.18*	1.6 $\pm$ 0.04

No tratamento crônico foi possível observar um aumento na atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo nos grupos Met, MetO e Met+MetO enquanto que no estriado houve um aumento da atividade da AChE nos grupos MetO e Met+MetO (Figura 2). As implicações fisiológicas bem como a relevância clínica da neurotransmissão colinérgica são numerosas. Um aumento da atividade da AChE como observado neste trabalho, poderia levar a uma diminuição dos níveis de ACh comprometendo assim a transmissão colinérgica a qual está relacionada com importantes funções como o alerta, o controle motor, o aprendizado e a memória (DREVER et al., 2011). Além disso, foi observado que o aumento da atividade da AChE no tratamento crônico pode estar relacionado com a menor capacidade de aprendizagem e memória observado nos testes comportamentais em todos os grupos experimentais.



**Figura 2:** Atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral (A), hipocampo (B), estriado (C) e cerebelo (D) de ratos jovens tratados por 21 dias com metionina (Met), metionina sulfóxido (MetO) e associação de metionina e metionina sulfóxido (Met+MetO). \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$  diferente do controle.

#### 4. CONCLUSÕES

Esses achados sugerem que altas concentrações de Met e/ou MetO alteram a atividade da enzima AChE, o que pode contribuir para as disfunções cerebrais principalmente no processo de aprendizagem e memória como observado nos testes comportamentais neste trabalho e em pacientes hipermetioninêmicos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos nestas alterações.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DREVER, B. D.; RIEDEL, G.; PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n.1, p.505–514, 2011.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.1, p. 88-95, 1961.
- FURUJO, M.; KINOSHITA, M.; NAGAO, M.; KUBO, T. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: Neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 107, n.1, p.253–256, 2012.
- MOSKOVITZ, J. Detection and localization of methionine sulfoxide residues of specific proteins in brain tissue. **Protein and Peptide Letters**, v. 21, n. 1, p. 52-55, 2014.
- STEFANELLO, F.M.; MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. **Journal Neuroscience Methods**, v.160, n.1, p.1-4, 2007.
- SURTEES, R.; LEONARD, J.; AUSTIN, S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. **Lancet**, v. 338, n.1, p. 1550–1554, 1991.