

## MODULAÇÃO DE BOMBAS IÔNICAS NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS: AÇÃO DO ÁCIDO TÂNICO

KARINA PEREIRA LUDUVICO<sup>1</sup>; JULIA EISENHARDT DE MELLO<sup>2</sup>; SARA  
KESKE<sup>2</sup>; SOLANGE VEGA CUSTÓDIO<sup>2</sup>; ROSELIA MARIA SPANEVELLO<sup>2</sup>;  
FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – karina\_luduvico@outlook.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – julia\_eisenhardt@hotmail.com

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

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

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

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

### 1. INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença psiquiátrica considerada um problema de saúde pública, tendo em vista sua grande prevalência mundial e alto impacto na qualidade de vida dos indivíduos depressivos (PITSILLOU et al., 2020). O estudo de mecanismos presentes em transtornos mentais pode envolver a utilização de modelos animais, como o de comportamento tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS). A indução periférica com LPS (endotoxina de bactérias gram-negativas) pela via intraperitoneal é capaz de ativar o receptor do tipo Toll-4 (TLR-4), estimular a inflamação sistêmica e induzir neuroinflamação através da passagem de mediadores inflamatórios pela barreira cérebro-sangue (O'CONNOR et al., 2009; PLANCHEZ et al., 2019).

A bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) é uma enzima fundamental para o equilíbrio osmótico e potencial de membrana, responsável pelo transporte ativo de íons (SMITH et al., 2021). A atividade dessa bomba iônica pode apresentar alterações em modelos animais de comportamento tipo-depressivo, conforme já observado na literatura (GAMARO et al., 2003; GOLDSTEIN et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2019). Outra enzima semelhante é a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, a qual efetua o balanço das concentrações citosólicas de cálcio através da energia liberada pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP). Além disso, essa enzima atua em processos de plasticidade sináptica (AMICI et al., 2009) e liberação de neurotransmissores (BRINI & CARAFOLI, 2011). Alterações no seu funcionamento são relatadas em transtornos psiquiátricos, como o Transtorno Bipolar (BRITZOLAKI et al. 2021).

O ácido tânico (AT) é um tanino hidrolisável adstringente formado por elevado número de grupos hidroxila, capaz de interagir com diversas biomoléculas (BALDWIN & BOOTH, 2022). Esse polifenol possui atividades biológicas a nível de sistema nervoso central (SNC) previamente descritas, como em modelos animais de Alzheimer, glioblastoma multiforme e comportamento tipo-depressivo (GERZSON et al., 2020; BONA et al., 2020; LUDUVICO et al., 2020).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi analisar o efeito do pré-tratamento com AT sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em estriado de camundongos submetidos ao modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Protocolo experimental

Para o experimento, camundongos Swiss machos com 60 dias de vida foram fornecidos pelo Biotério Central da UFPEL (CEEA nº 32979/2019) após prévia aprovação do projeto na Comissão de Ética. Os animais receberam AT (30 mg/kg ou 60 mg/kg, via intragástrica) ou fluoxetina (20 mg/kg, via intragástrica) por 7 dias. No último dia de tratamento, foi realizada a indução do comportamento tipo-depressivo utilizando o LPS (0,83 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.) (O'CONNOR et al., 2009). Após 24 horas, foi realizado o teste comportamental de suspensão da cauda (TSC) e a eutanásia (indução pelo anestésico Isoflurano) para remoção do estriado.

### 2.2 Teste de suspensão da cauda (TSC)

A avaliação comportamental foi realizada de acordo com Steru et al. (1985). Os animais foram suspensos pela cauda por uma fita adesiva, colocada a 1 cm da ponta da cauda (50 cm acima do chão). A duração total da imobilidade foi observada por 6 minutos.

### 2.3 Atividade da $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

O estriado foi homogenizado em tampão Tris-HCl 10 mM (pH = 7,4) e centrifugado para coleta do sobrenadante. O ensaio da sódio-potássio ATPase baseia-se na liberação de fosfato ( $\text{Pi}$ ) utilizando o método verde de malaquita (CHAN et al., 1986) com ATP como substrato. A atividade foi expressa como nmol de  $\text{Pi}$ /min/mg de proteína (CARVALHO et al., 2012). A avaliação da cálcio ATPase foi feita de acordo com Pacheco et al. (2018), e a atividade expressa como nmol de  $\text{Pi}$ /min/mg de proteína. As detecções foram feitas em espectrofotômetro a 630 nm (SpectraMax 190).

### 2.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* de Tukey (GraphPad Prism 5). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro médio padrão e considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É possível observar, referente aos dados do TSC, que os animais do grupo LPS apresentaram tempo elevado de imobilidade comparado ao grupo controle ( $P < 0,001$ ), de acordo com a Figura 1. Entretanto, os pré-tratamentos com fluoxetina e AT (60 mg/kg) foram capazes de prevenir essa alteração ( $P < 0,001$ ). A avaliação do TSC é relevante para validar a indução do comportamento tipo-depressivo (em 24 h) após a resolução do *sickness behavior*. É um teste amplamente utilizado, considerado uma ferramenta válida para o *screening* de potenciais fármacos no TDM (STUKALIN et al., 2020). Sendo assim, o produto natural utilizado apresentou ação tipo-antidepressiva.

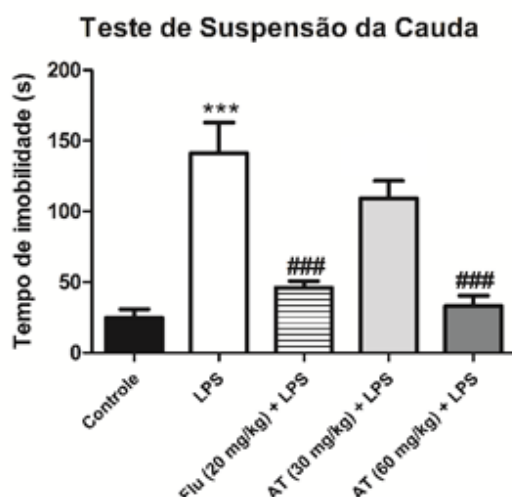


Figura 1: Efeito do pré-tratamento com fluoxetina (20 mg/kg) e ácido tânico (30 ou 60 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais submetidos ao teste de suspensão da cauda. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão. (\*\*\*)  $P < 0,001$  comparado ao grupo controle; (###)  $P < 0,001$  comparado ao grupo LPS.

A atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase apresentou diminuição no estriado de camundongos do grupo LPS em comparação aos animais controle ( $P < 0,05$ ), conforme observado na Figura 2A. Contudo, o pré-tratamento com AT (30 e 60 mg/kg) foi capaz de modular essa enzima e prevenir a redução de sua atividade. A inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase parece estar relacionada com maior suscetibilidade neuronal à excitotoxicidade do glutamato, bem como alterações na transmissão sináptica (KINOSHITA et al., 2016). Nesse contexto, o AT apresentou efeitos promissores com a modulação enzimática no estriado.

No presente trabalho, a administração de LPS não causou alteração na atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no estriado dos animais em nenhum dos grupos avaliados (Figura 2B).

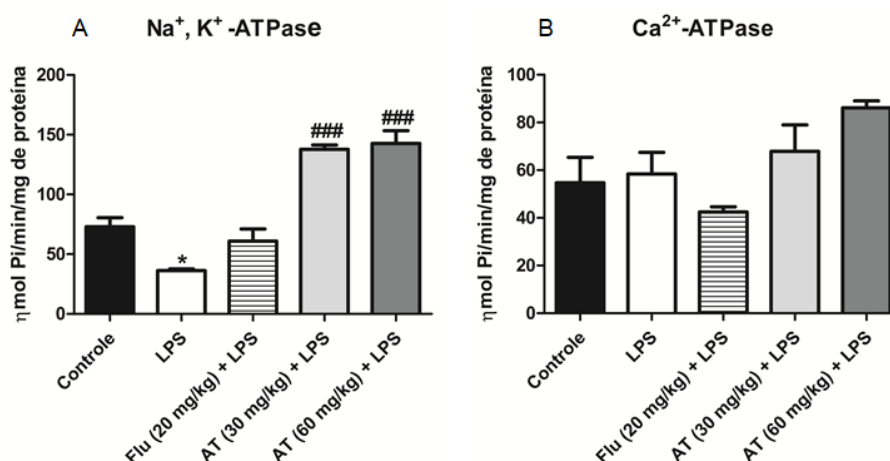


Figura 2: Efeito do pré-tratamento com fluoxetina (20 mg/kg) e ácido tânico (30 ou 60 mg/kg) sobre a atividade das enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (A) e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (B) no estriado de animais submetidos ao modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro médio padrão. (\*)  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; (###)  $P < 0,001$  comparado ao grupo LPS.

#### 4. CONCLUSÕES

O AT apresentou atividade tipo-antidepressiva no TSC na maior dose testada, bem como foi capaz de modular a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no

estriado de camundongos em ambas as doses. Sendo assim, esse tanino pode ser considerado uma possível abordagem terapêutica no manejo do TDM.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PITSILLOU et al. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. **Molecular Biology Reports**, v. 71, n. 1, p. 753-770, 2020.

O'CONNOR et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, 511-522, 2009.

PLANCHEZ et al. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383-1408, 2019.

SMITH et al. Early role for a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase (ATP1A3) in brain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 25, e2023333118, 2021.

AMICI et al. Neuronal calcium sensors and synaptic plasticity. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 6, p. 1359-1363, 2009.

BRINI & CARAFOLI. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, a004168, 2011.

BRITZOLAKI et al. Chronic but not acute pharmacological activation of SERCA induces behavioral and neurochemical effects in male and female mice. **Behavioral Brain Research**, v. 399, 112984, 2021.

BALDWIN & BOOTH. Biomedical applications of tannic acid. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 8, p. 1503-1523, 2022.

GERZSON et al. Tannic acid ameliorates STZ-induced Alzheimer's disease-like impairment of memory, neuroinflammation, neuronal death and modulates akt expression. **Neurotoxicity Research**, v. 37, p. 1009-1017, 2020.

BONA et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, p. 283-293, 2020.

LUDUVICO et al. Antidepressant effect and modulation of the redox system mediated by tannic acid on lipopolysaccharide-induced depressive and inflammatory changes in mice. **Neurochemical Research**, v. 45, p. 2032-2043, 2020.

STERU et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370, 1985.

CHAN et al. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986.

CARVALHO et al. Spermidine decreases Na<sup>(+)</sup>, K<sup>(+)</sup> -ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, p. 79-86, 2012.

PACHECO et al. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 193-204, 2018.

STUKALIN et al. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 112, p. 39-47, 2020.

KINOSHITA et al. The influence of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 195, 2016.