

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM ESTRIADO E LINFÓCITOS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

PÂMELA CRISTINA DE LIMA AVELAR¹; FABIANO J. S. SOARES²; ROSÉLIA MARIA SPANEVELLO², CAROLINE DOS SANTOS MACHODO²; GIOVANA DUZZO GAMARO³, IZABEL CRISTINA CUSTÓDIO SOUZA³

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– pamela_avelar@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– fabiano_soares11@hotmail.com,
rspanevello@gmail.com, smachado.caroline@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– giovanagamaro@hotmail.com,
belcustodio20@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A resposta ao estresse em mamíferos é caracterizada pela ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e ativação do sistema nervoso periférico (SNP). A ativação do eixo HHA causa aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. Este, por sua vez, induz a liberação de glicocorticóides (GCs) pelo córtex da glândula supra-renal. Desta forma, a resposta do organismo ao estresse, mediada pela ativação do eixo HHA, resulta em uma série de alterações fisiológicas e fenotípicas a curto e longo prazo (1;2). A liberação contínua de glicocorticóides em situações de estresse crônico causa alterações relacionadas ao sistema imunológico.

Os glicocorticóides, marcadores da resposta ao estresse, possuem efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores e imunomoduladores em condições normais (3). Porém, existe a modulação de uma série de neurotransmissores frente a situações de estresse, como por exemplo: dopamina, noradrenalina, serotonina e acetilcolina.

A acetilcolina é um neurotransmissor que está associado com a manutenção de processos de atenção, aprendizagem e memória. Na fenda sináptica a acetilcolina é degradada por enzimas colinesterásicas, a acetilcolinesterase (AChE) e a Butirilcolinesterase (BuChE). O aumento da atividade de frações da AChE vem sendo associada com estados de demência em pacientes idosos e com a perda da função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer. Dados da literatura têm demonstrado alterações no metabolismo da acetilcolina (ACh) em relação às alterações em seus níveis cerebrais, bem como na atividade da enzima responsável por sua síntese, a colina acetiltransferase (ChAT). Além de sua função no sistema nervoso central, estudos têm demonstrado que esta molécula pode ser sintetizada e liberada por linfócitos, indicando que a ACh além de seu papel na neurotransmissão, possui um função crucial na resposta imunológica. A ACh pode ser sintetizada e liberada pelos linfócitos e atua através de receptores nicotínicos e muscarínicos dos próprios linfócitos. A ACh possui funções específicas como controlar o recrutamento e aumentar a capacidade bactericida dos neutrófilos e macrófagos, sendo que a ativação de receptores nicotínicos $\alpha 7$ reduz a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), o que reduz processos inflamatórios locais (4;5).

Trabalhos de pesquisa provenientes do campo da neuroimunomodulação vêm tornando explícitas as intrincadas relações existentes entre o sistema

nervoso central (SNC) e o sistema imunitário (SI). Esses trabalhos suportam a existência de comunicações diretas e bidirecionais entres os dois sistemas (6;7).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade da AChE em encéfalo (estriado) e linfócitos de ratos submetidos ao estresse crônico variável durante 50 dias.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 16 ratos machos adultos (90 dias de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais foram mantidos, durante todo o período experimental, em um ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), com 55-75% de umidade e com um ciclo de 12 horas claro/escuro, com alimentação *ad libitum*. Todos os experimentos seguiram as normas gerais, nacionais e internacionais, que regem a experimentação efetuada com animais (8;9). Este trabalho possui aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (n° 10.326).

Os animais foram submetidos ao modelo de estresse crônico variado, sendo divididos em dois grupos: controle e estresse, com 8 animais por grupo. Os animais do grupo controle permaneceram em suas caixas moradia durante todo o período experimental sem manipulação, exceto para limpeza das caixas-moradia. Os animais do grupo estressado foram submetidos a 50 dias de estresse (10) contando durante o período com 6 diferentes agentes estressores em um cronograma aleatório, sendo eles: imobilização; imobilização + frio (4°C); natação forçada; luz piscante; isolamento; inclinação da caixa e exposição ao ruído.

Após a última sessão de exposição ao estresse, os animais foram submetidos à eutanásia a fim de coletar sangue para análises posteriores.

Para avaliação dos linfócitos foi coletado 3 mL de plasma (EDTA como anticoagulante). Os linfócitos foram obtidos pela técnica de gradientes de densidade Ficoll-Histopaque como descrito por Böyum (1968).

Para avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase no SNC, o encéfalo foi dissecado em estriado e armazenado a -80°C até a realização do ensaio bioquímico.

A atividade da acetilcolinesterase em estriado e linfócitos, foi determinada pelo método de ELLMAN et al. (11), modificado por Rocha; Emanuelli; Pereira (1993). A atividade da AChE foi medida através do aumento da absorbância a 412nm e expressa em micromoles de AcSCh/h/mg de proteína.

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Foi utilizado o Teste t de Student para amostras independentes, sendo considerados significativos os valores inferiores a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pudemos observar um aumento na atividade da AChE no estriado dos animais submetidos ao estresse crônico variado em comparação com os controles. Como demonstrado na Figura 1, os animais do grupo estresse apresentaram um aumento na atividade da AchE de 39% quando comparado ao controle. Porém, ao avaliarmos a atividade da AChE em linfócitos, exposto na Figura 2, não foi observado diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

Atividade AChE estriado

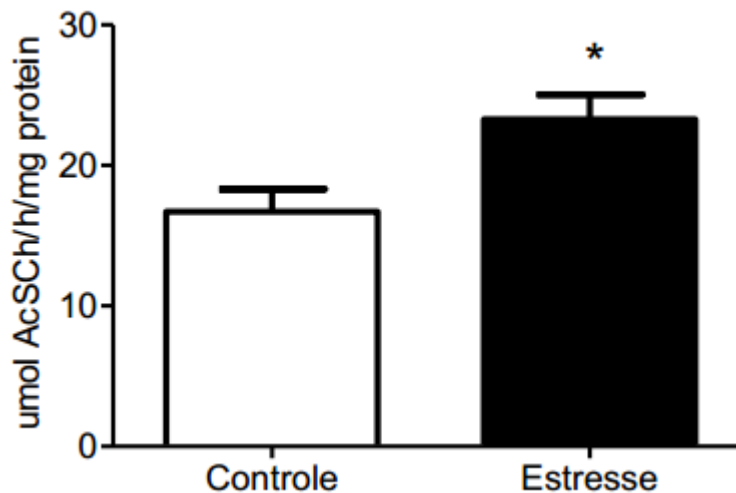


Figura 1 – Atividade da AChE em estriado de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student, $p < 0,05$). A atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

Atividade AChE linfócitos

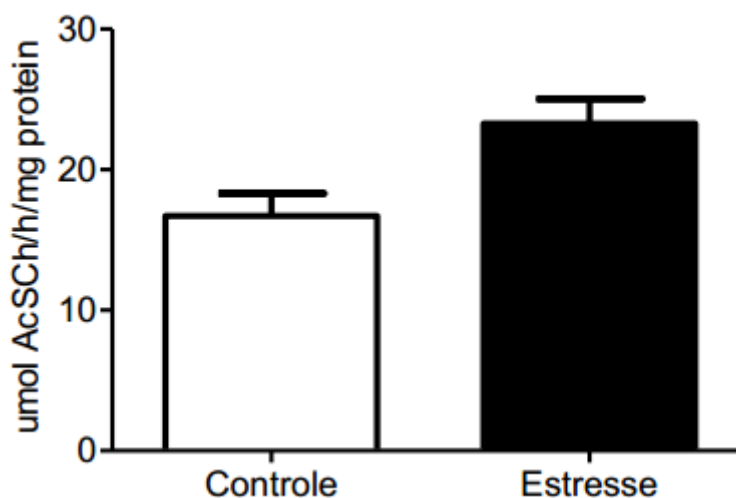


Figura 2 – Atividade de AChE em linfócitos de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias. Dados expressos como média \pm desvio padrão. A atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

Evidências recentes sugerem que a AChE pode ter um papel importante na co-regulação do processo inflamatório, mediado por acetilcolina. Este neurotransmissor atua inibindo a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL-1 β (interleucina-1 beta) e fator inibidor da migração de macrófagos (12).

A atividade desta enzima pode causar uma possível deficiência de acetilcolina na capacidade de regulação de processos inflamatórios, o que explicaria, pelo menos em parte, as alterações nos níveis de citocinas descritas acima. Trabalhos anteriores demonstraram que o mesmo modelo usado em nosso estudo induziu a ativação imunitária, aumentando os níveis de citocinas e

da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de ratos (3). As respostas, em virtude do protocolo de estresse apresentado, mostraram que o efeito sobre os níveis de acetilcolinesterase pode ocorrer em diferentes estruturas do sistema nervoso central.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que o modelo experimental de estresse crônico variado causou aumento na atividade da AChE no estriado dos animais. No entanto, esse efeito não foi observado ao analisarmos os linfócitos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 DE KLOET, E.R. ET AL. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 47, p. 183-190, dez. 1993.
- 2 EINARSSON, S.; BRANDT, Y.; LUNDEHEIM, N.; MADEJ, A.; Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet Scand.* p. 48-50, 2008.
- 3 TAGLIARI, B. ET AL. Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Springer Science + Business Media*, v.36, p.487-493, 2011.
- 4 KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & therapeutics*, v. 86, p, 29-48, 2000.
- 5 WANG H. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.
- 6 ZUNSZAINA, P. ET AL. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression, 2011.
- 7 MILLER, A.H.; MALETIC, V.; RAISON, C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 2009.
- 8 LANZIOTTI, V. ET AL. *Rev. Pesq. Med*, v. 28, p. 26-30, 1994.
- 9 GOLDIM, J.R. *Pesquisa em saúde: Leis, normas e diretrizes*. 2ª ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, 1995. 528p.
- 10 GAMARO, G. ET AL. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochemistry International*, 42, 107–114, 2003.
- 11 ELLMAN, G.L. ET AL. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p. 88–95, 1961.
- 12 BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M., ET AL. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* v. 405, p. 458–462, 2000.