

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas



Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação de parâmetros comportamentais e atividade da enzima
acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo
experimental de estresse crônico variado**

Fabiano Jose Souza Soares

Pelotas, 2014

Fabiano Jose Souza Soares

**Avaliação de parâmetros comportamentais e atividade da enzima
acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo
experimental de estresse crônico variado**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial para obtenção de título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Roselia Maria Spanevello
Co-orientadora: Giovana Duzzo Gamaro

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S676a **Soares, Fabiano José Souza**

Avaliação de parâmetros comportamentais e atividade da enzima acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de estresse crônico variado / Fabiano José Souza Soares. – 33f. – Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Roselia Maria Spanevello ; coorientador Giovana Duzzo Gamaro.

Fabiano Jose Souza Soares

Avaliação de parâmetros comportamentais e atividade da enzima acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de estresse crônico variado

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 10/11/2014

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello (Orientadora) doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Prof^a. Dr^a. Adriana Lourenço da Silva doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos, familiares e amigos.

Agradecimentos

Aos meus pais José Maria Soares e Ester Leatrice Souza, pelo incentivo, amor e inspiração ao longo desses anos. Exemplos de vida e força de vontade.

Ao meu Irmão Jules, por servir como exemplo de pessoa e profissional, além de grande amigo e apoiador.

À minha irmã Caroline Aparecida, pelo sorriso contagiante, bom humor e sensibilidade que tanto me orgulham.

À minha namorada Caroline Machado, pelo amor, atenção, sorriso e apoio incondicional ao longo dessa trajetória que iniciamos juntos, quando ainda não haviam certezas sobre o que nos esperava. Só nós sabemos tudo que passamos, aprendemos e vivemos ao longo desses anos. Obrigado por fazer parte da minha vida, muito do que sou é devido a ti. Te amo.

Aos meus sogros Claudete Machado e Carlos Fernando, pelo apoio, credibilidade e motivação em todos os momentos.

À “vó” Marlene e toda sua família, por me receberem de braços abertos com muita simpatia e carinho.

Aos tios Odilon e Odete, pelo apoio, carinho e confiança. Muito Obrigado por tudo.

Aos amigos Richard, Felipe, Juliana, Lucas, Cris e Dani pelo conhecimento, discussões, risadas e brincadeiras compartilhadas ao longo desses cinco anos. Histórias e lembranças que levarei comigo para sempre.

Aos amigos que deixei por um tempo Eduardo, Pecetti, João e Fernando, pela parceria de irmão que a distância não afasta.

Às amigas (e amigo) Jeje, Nati, Bruna, Ana e Felipinho, pelas risadas, viagens, furadas e festas que jamais esquecerei.

À minha cunhada Fernanda pela amizade, sinceridade e bom humor.

Aos meus tios, primos e avós pelo apoio, hospedagem e disponibilidade em todos os momentos em que precisei. Contem sempre comigo.

Aos colegas de graduação, pelo conhecimento compartilhado ao longo desses anos.

Aos colegas de laboratório, por enriquecerem minha trajetória acadêmica com seus conhecimentos.

Aos mestres, pelo aprendizado fornecido.

Ao contribuinte, sem o qual jamais poderia ter estudado em uma instituição de ensino público.

E por último, agradeço às minhas orientadoras Roselia Spanevello, Giovana Gamaro e Elizandra Braganhol, por terem disponibilizado tanto tempo para minha formação profissional e pessoal, conduzindo minha trajetória com muito brilhantismo, amizade e profissionalismo. Obrigado por compartilharem seus conhecimentos e experiências comigo.

“O conhecimento nos faz responsáveis”.
(*CHE GUEVARA*)

RESUMO

SOARES, Fabiano Jose Souza. **Avaliação de parâmetros comportamentais e atividade da enzima acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de estresse crônico variado.** 2014. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Todos os organismos desencadeiam mecanismos para reagir às mudanças no seu ambiente externo e/ou interno, que representam situações de estresse. O estresse crônico pode induzir alterações no humor, no comportamento alimentar, na memória, entre outros. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor com importante papel em funções cognitivas como aprendizado e memória. Além disso, essa molécula exerce função regulatória na resposta imune. A ação da ACh é finalizada através de sua hidrólise pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE tem sido considerada um importante alvo terapêutico em muitas condições patológicas pelo fato de controlar as ações da ACh. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar parâmetros comportamentais alimentares e a atividade da AChE em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado (ECV). Foram utilizados ratos machos que foram divididos em dois grupos: controle e estressado. A indução do estresse consistiu na aplicação diária de diferentes estressores, a cada dia durante 50 dias, variando em sua duração e no período de aplicação. Aos 44 dias os animais foram habituados à tarefa de comportamento alimentar durante cinco dias e após esse período realizou-se o teste comportamental no estado de jejum e alimentado. Após os 50 dias de ECV os animais foram submetidos à eutanásia e o encéfalo foi removido e dissecado em córtex, hipocampo, estriado e hipotálamo. O sangue total foi utilizado para a separação de linfócitos. A atividade da AChE foi determinada nas estruturas cerebrais e linfócitos e expressa em $\mu\text{mo/AChhidrolisada/hora/mg}$ de proteína. Os animais submetidos ao estresse crônico variado diminuíram o consumo de alimento palatável e apresentaram aumento na atividade da enzima AChE em córtex cerebral, hipocampo, estriado e hipotálamo quando comparado ao grupo controle ($P < 0.05$). Por outro lado, a atividade da AChE de linfócitos não apresentou diferença em relação ao grupo controle. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o modelo experimental de estresse crônico variado gerou um quadro de anedonia nos animais. Além disso, o estresse foi capaz de alterar a sinalização colinérgica em diferentes regiões cerebrais. Esses achados podem contribuir para um melhor entendimento sobre as adaptações do organismo frente a agentes estressores.

Palavras chave: Acetilcolinesterase; Estresse Crônico Variado, Comportamento Alimentar; Linfócitos, Encéfalo.

ABSTRACT

SOARES, Fabiano Jose Souza. **Evaluation of behavioral parameters and activity of the enzyme acetylcholinesterase in brain and lymphocytes from rats subjected to an experimental model of chronic variable stress.** 2014. 33f.

Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas –
Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

All organisms trigger mechanisms to react to changes in its external and/or internal environment, representing stress situations. Chronic stress can induce changes in mood, eating behavior, memory, among others. Acetylcholine (ACh) is the neurotransmitter role in cognitive functions such as learning and memory in addition this molecule exerts regulatory role in the immune response. The action of ACh is terminated by its hydrolysis by the enzyme acetylcholinesterase (AChE). AChE has been considered an important therapeutic target in many pathological conditions because of controlling the actions of ACh. Therefore, the objective of this study was to evaluate dietary behavioral parameters and AChE activity in brain and lymphocytes from rats subjected to chronic variable stress model (CVE). Control and stressed: male rats were divided into two groups were used. The induction of stress consisted of daily application of different stressors, every day for 50 days, varying in duration and the period of application. After 44 days the rats were habituated to the task of feeding behavior during five days and thereafter held behavioral test in the fasting state and powered. After 50 days of CVE animals were euthanized and the brain was removed and dissected into cortex, hippocampus, striatum and hypothalamus. Whole blood was used for the separation of lymphocytes. The AChE activity was determined in brain and lymphocytes structures and expressed in $\mu\text{mol}/\text{ACh}/\text{hour}/\text{mgprotein}$. Animals subjected to chronic varied stress decreased consumption of palatable food and showed an increase in AChE activity in the cerebral cortex, hippocampus, striatum and hypothalamus compared with the control group ($P < 0.05$). Moreover, AChE activity of lymphocytes showed no difference compared to the control group. From the results obtained, it can be concluded that the experimental model of variable chronic stress generated box anhedonia in animals. In addition, stress alters cholinergic signaling in different brain regions. These findings may contribute to a better understanding of the adaptations of the organism to stressors.

Key-words: Acetylcholinesterase; Chronic Variable Stress, Feeding Behavior; Lymphocytes, Brain.

Lista de Figuras

Figura 1	Consumo de alimento palatável no estado alimentado	22
Figura 2	Consumo de alimento palatável no estado jeju	23
Figura 3	Atividade AChE córtex cerebral	23
Figura 4	Atividade AChE hipocampo	24
Figura 5	Atividade AChE hipotálamo	24
Figura 6	Atividade AChE estriado	25
Figura 7	Atividade AChE linfócitos	25

Lista de Tabelas

Tabela 1	Cronograma de estressores	19
----------	---------------------------------	----

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1 Objetivos	14
1.1.1 Geral	14
1.1.2 Específicos	14
2. Revisão de Literatura	15
3. Material e Métodos.....	18
3.1 Animais	18
3.2 Exposição ao estresse crônico variado.....	18
3.3 Avaliação do comportamento alimentar	19
3.4 Procedimentos de coleta do material biológico	20
3.5 Análises Bioquímicas	20
3.5.1 Determinação da Atividade da AChE em estruturas cerebrais e linfócitos	20
3.5.2 Determinação de Proteínas	21
3.6 Análise estatística	21
4. Resultados	22
5. Discussão.....	26
6. Conclusão	28
Referências	29

1 Introdução

Ao longo do processo evolutivo, sistemas biológicos foram selecionados para responder de maneira eficiente às mudanças em seu ambiente externo e/ou interno. Neste sentido, à medida que os organismos aumentaram sua complexidade fisiológica, a resposta individual frente a estímulos estressores também sofreu alterações. Nos mamíferos, a resposta ao estresse é executada, em parte, pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), resultando no aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, que estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior. O ACTH induz a liberação de glicocorticosteróides (GCs) pelo córtex da adrenal, o que resulta em uma série de alterações fisiológicas e fenotípicas a curto e longo prazo (DE KLOET et al, 1993; EINARSSON, 2008).

Para mimetizar os efeitos fisiológicos do estresse em humanos são utilizados modelos animais que auxiliam na compreensão da dinâmica entre o ambiente e o organismo. Modelos de estresse crônico têm sido relacionados como indutores de alterações no humor, no comportamento alimentar, na memória, entre outros. Dependendo do tipo de modelo utilizado, as alterações podem ser diferenciadas. Em modelos de estresse crônico que utilizam apenas um tipo de agente estressor com duração e período de aplicação fixa, pode-se observar uma habituação do organismo ao estresse (ELY et al, 1997; GAMARO et al, 1999).

Em modelos de ECV, onde se utilizam mais de um tipo de agente estressor com durações diferenciadas e períodos de aplicação variáveis, o efeito da habituação não é observado. Este modelo tem como característica a imprevisibilidade, ou seja, o animal tem dificuldade em adaptar-se aos agentes estressores, bem como ocorre no cotidiano de um ser humano. Este modelo está relacionado com o desenvolvimento de desordens afetivas como, por exemplo, ansiedade ou depressão (MARTI et al, 1993; WILLNER, 2005).

O processamento cognitivo de mamíferos é mediado pela acetilcolina (ACh), que é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) responsável pelo aprendizado e consolidação de memória. A sinalização induzida por esta molécula na fenda sináptica é controlada pela acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da ACh em acetato e colina. Esta enzima é encontrada principalmente em sinapses do SNC, periférico autônomo e junção neuromuscular, sendo considerada um importante alvo terapêutico em muitas doenças neurológicas como, por exemplo, a Doença de Alzheimer (DAS et al, 2000).

Além de sua função no SNC, estudos têm demonstrado que esta molécula pode ser sintetizada e liberada por linfócitos, indicando que a ACh além de seu papel na neurotransmissão possui uma função crucial na resposta imunológica. A ACh atua através de receptores nicotínicos e muscarínicos dos próprios linfócitos. Esta molécula apresenta 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 fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que reduz processos inflamatórios locais (KAWASHIMA; FUJII, 2000; REARDON et al, 2013; WANG, 2003).

Neste contexto, é importante ressaltar que um estudo demonstrou que o estresse crônico é capaz de aumentar a atividade da AChE cerebral de ratos, sugerindo assim, que essas situações exercem influência sobre parâmetros do sistema colinérgico (DAS et al, 2000). Além disso, em um modelo de ECV conduzido por Dang et al (2009), foi observado um aumento na expressão da AChE em hipocampo de ratos. Embora esses trabalhos tenham demonstrado alterações na sinalização colinérgica associada ao estresse é importante salientar que o tempo e a tipo de agente estressor usado em cada modelo experimental pode causar alterações diferenciadas.

Sendo assim, considerando a importância terapêutica da enzima AChE em disfunções neurológicas e seu papel como moduladora da resposta imune, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade desta enzima em diferentes estruturas cerebrais bem como em linfócitos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar parâmetros comportamentais e a atividade da acetilcolinesterase em encéfalo e linfócitos de ratos submetidos a um modelo experimental de estresse crônico variado.

1.1.2 Específicos

- Avaliar parâmetros comportamentais alimentares de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Verificar a atividade da AChE no córtex, hipocampo, hipotálamo e estriado de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Analisar a atividade da AChE em linfócitos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

2 Revisão da literatura

O conceito de estresse foi primeiramente proposto por Hans Selye, sendo definida como uma série de reações sistêmicas não específicas que ocorrem quando um sistema biológico é exposto a situações que representam risco a sua integridade. Em seus experimentos, Selye observou alterações semelhantes em animais submetidos a situações de estresse, como aumento das glândulas adrenais e diminuição de órgãos responsáveis pela produção de células do sistema imune, definindo essas alterações fisiológicas como “Síndrome da Adaptação Geral (SGA)” (SELYE, 1936).

Modernamente o estresse é considerado um estado fisiológico de resposta do organismo a diferentes situações que causam alterações na homeostase do corpo. Essa resposta, frente a uma situação de estresse, inclui a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal culminando com a liberação dos glicocorticoides. Esses hormônios liberados podem modular a função neuroendócrina, o comportamento alimentar bem como aspectos cognitivos, sendo que seus efeitos dependerão da intensidade, duração e tipo de agente estressor (EINARSSON, 2008).

Diversos modelos de estresse vêm sendo descritos na literatura como indutores de alterações no humor, no comportamento alimentar, na memória e no sistema imune. Dependendo do tipo de modelo utilizado, as alterações podem ser diferenciadas. A partir dos resultados obtidos por estes experimentos, é possível compreender as alterações fisiológicas que o estresse pode causar em sistemas biológicos de mamíferos. Esses conhecimentos auxiliam, inclusive, na produção de fármacos para ansiedade e depressão (WILLNER, 1997). Diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo contribuem para a produção de conhecimento sobre modelos de estresse e suas implicações biológicas.

Estudos com animais demonstram que diferentes modelos de estresse são capazes de desencadear variadas respostas fisiológicas, como déficits de memória, diminuição do consumo de água e alimentos, ansiedade e distúrbios do sono (KATZ et al, 1982; MCEWEN et al, 1997). Willner (1997) observou diminuição do consumo de solução palatável contendo sacarose em modelos animais submetidos ao estresse crônico, o que caracteriza a anedonia.

Gronli; Murison; Fiske (2003) submeteram ratos machos adultos a um modelo de estresse crônico variado e observaram diminuição na ingestão de solução contendo sacarose, comportamento agressivo, redução da atividade sexual e diminuição do peso corpóreo. Por outro lado, não foram observadas alterações nos níveis de citocinas, sugerindo que o modelo não exerceu influência na resposta imune. Em estudo realizado por Froger; Palazzo; Boni (2004), onde ratos foram submetidos ao modelo de estresse crônico, foi possível observar um aumento significativo das glândulas adrenais devido à liberação excessiva de glicocorticoides em resposta aos agentes estressores.

Além das alterações comportamentais, há relatos na literatura de que o estresse por imobilização causa peroxidação lipídica, proteica e danos no DNA de células cerebrais (LIU et al, 1996). Torres et al (2002) observaram que o estresse crônico por imobilização aplicado em um período de 40 dias é capaz de promover estresse oxidativo em células do pulmão de ratos adultos. Ratos machos adultos submetidos a um protocolo de estresse crônico apresentaram déficits de aprendizado, problemas de memória e transtornos de humor que se assemelham a ansiedade. Essas alterações foram atribuídas a diminuição de acetilcolina na fenda sináptica, devido à atividade aumentada da enzima AChE nestes animais (SRIKUMAR; RAJU; SHANKARANARAYANA RAO, 2006). Em outro estudo, onde ratos foram submetidos ao modelo de ECV, os animais apresentaram comportamento depressivo, com diminuição no peso corpóreo, elevação na atividade da AChE em hipocampo e aumento no tempo de imobilidade medido no teste de natação forçada (TAGLIARI et al, 2011).

A acetilcolina, além de sua função clássica na neurotransmissão, apresenta importância na via colinérgica anti-inflamatória, inibindo a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1 β (interleucina-1 beta) e fator inibitório de migração dos macrófagos (GNATEK et al, 2012).

Estudos relatam que a inibição da AChE reduz a proliferação de linfócitos, porém o mecanismo envolvido neste processo permanece desconhecido (NIZRI, et al 2005). Além disso, o sistema colinérgico extraneural dos linfócitos possui ação direta sobre o controle da resposta imune inata. Além disso, Wang; Zhang; Tang (2010) em estudo com cultura de células gliais tratadas com ACh e inibidores da AChE confirmaram a ação anti-inflamatória da ACh através da via colinérgica extraneural.

3 Material e Métodos

3.1 Animais experimentais

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 ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$), com 55-75% de umidade e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. As dietas, tanto sólida quanto hídrica, foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos seguiram as normas gerais, nacionais e internacionais, que regem a experimentação efetuada com animais (LANZIOTTI et al, 1994; GOLDIM, 1995). Todos os procedimentos que envolveram os animais só foram realizados após a aprovação desse estudo pelo comitê de Ética em Experimentação animal da UFPel (nº 10.326).

3.2 Exposição ao estresse crônico variado

Para a exposição ao estresse crônico variado, os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo estressado, 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. Os animais do grupo estressado foram submetidos a 50 dias de estresse (TORRES, 2002; ROZISKY et al, 2008).

Os animais do grupo estressado foram submetidos a diferentes agentes estressores em um cronograma aleatório de estressores (Tabela 1), sendo eles: imobilização por 1-2h; imobilização + frio (4°C) 1-2h; natação forçada por 10-15min; luz piscante por até 3h; isolamento por 24h; inclinação da caixa moradia 3-6h; exposição ao ruído 10-15min, durante 50 dias (GAMARO et al, 1999).

Tabela 1 – Cronograma de estressores.

Dia	Estressor	Duração	Dia	Estressor	Duração
1	Inclinação da caixa	4h	26	Isolamento	24h
2	Ruído	10min	27	Isolamento	24h
3	Natação forçada	10min	28	Estressor não aplicado	-
4	Luz piscante	3h	29	Luz piscante	3,5h
5	Restrição de movimentos	1h	30	Ruído	10min
6	Isolamento	24h	31	Inclinação	4,5h
7	Isolamento	24h	32	Restrição	3h
8	Isolamento	24h	33	Estressor não aplicado	-
9	Luz piscante	2,5h	34	Natação	15min
10	Restrição movimentos + frio	2h	35	Luz piscante	2h
11	Inclinação da caixa	5h	36	Restrição + frio	2h
12	Ruído	15min	37	Isolamento	24h
13	Estressor não aplicado	-	38	Isolamento	24h
14	Estressor não aplicado	-	39	Luz piscante	3h
15	Luz Piscante	2,5h	40	Natação	10min
16	Natação	15min	41	Inclinação da caixa	4h
17	Isolamento	24h	42	Ruído	10min
18	Isolamento	24h	43	Natação forçada	10min
19	Isolamento	24h	44	Luz piscante	3h
20	Inclinação da caixa	6h	45	Restrição de movimentos	1h
21	Ruído	10min	46	Isolamento	24h
22	Luz Piscante	3h	47	Isolamento	24h
23	Restrição movimentos	2h	48	Isolamento	24h
24	Natação	10min	49	Luz piscante	2,5h
25	Restrição movimentos + Frio	1,5h	50	Restrição movimentos + frio	2h

3.3 Avaliação do comportamento alimentar

A avaliação do comportamento alimentar foi iniciada sete dias antes da eutanásia, dentro dos 50 dias de estresse, sendo os cinco primeiros dias utilizados para habituar os animais ao novo alimento e os últimos dois para os testes em estado alimentado e em jejum. Os animais foram acondicionados em uma caixa retangular iluminada (40x15x20cm) com o piso e as paredes laterais feitas de madeira e superfície em acrílico. Cada animal foi submetido à tarefa durante 3min, durante cinco dias, a fim de habituá-lo ao tipo de alimento utilizado (Froot Loops®).

Kelloggs - rosquinhas de trigo, amido de milho e sacarose). Dez Froot Loops® foram colocados em uma extremidade da caixa. Após habituação, os animais foram expostos por 3min à sessão de teste. Ao final, o número de rosquinhas ingeridas foi contado. Esta tarefa foi realizada na ausência e presença de jejum (ELY et al, 1997; GAMARO et al 2008;).

3.4 Procedimentos de coleta do material biológico

Após a última sessão de exposição ao estresse os animais foram submetidos a eutanásia com uso de guilhotina e o sangue foi coletado do tronco (cerca de 3 ml). O sangue foi alocado em tubos contendo EDTA como anticoagulante para isolamento de linfócitos através de um gradiente de densidade usando Ficoll-Histopaque como descrito por Böyum (1968). O encéfalo foi dissecado em córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e estriado e essas estruturas cerebrais foram armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

3.5 Análises bioquímicas

3.5.1 Determinação da atividade da AChE em estruturas cerebrais e linfócitos

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em Tris-HCl 10mM (pH 7,4) e centrifugadas a 1400rpm por 10min. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático e a atividade da AChE foi determinada espectrofotometricamente por meio do método de ELLMAN et al (1961), modificado por Rocha; Emanuelli; Pereira (1993). A atividade da AChE foi medida através do aumento da absorbância a 412nm. Esta atividade foi expressa em micromoles de AcSCh/h/mg de proteína. A atividade da AChE em linfócitos foi determinada imediatamente após a separação destas células, de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) modificado por Fitzgerald; Costa (1993) e expressa em micromoles de AcSCh/h/mg de proteína.

3.5.2 Determinação de proteínas

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de *Coomassie Blue* (Bradford, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. As comparações entre os dois grupos experimentais foram realizadas pelo Teste t de Student para amostras independentes. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

4. Resultados

O efeito do ECV sobre a ingestão de rosquinhas palatáveis no estado jejum e alimentado é mostrado nas figuras 1 e 2. Os animais do grupo estresse apresentaram uma ingestão média menor, tanto em estado alimentado quanto em jejum, quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o protocolo de estresse utilizado neste estudo diminuiu o consumo de alimento palatável. O protocolo aplicado alterou a atividade da AChE em diferentes estruturas cerebrais, mas não em linfócitos. As figuras 3, 4, 5 e 6 demonstram que o ECV aumentou significativamente a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e estriado, respectivamente. A atividade da AChE no córtex aumentou 68% quando comparado ao grupo não estressado ($P < 0,05$). O mesmo aumento na atividade da enzima foi observado no hipocampo (48%), no hipotálamo (46%) e estriado (39%) quando comparado com o grupo controle ($P < 0,05$). Na atividade da AChE de linfócitos (Figura 7) não foi observado diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

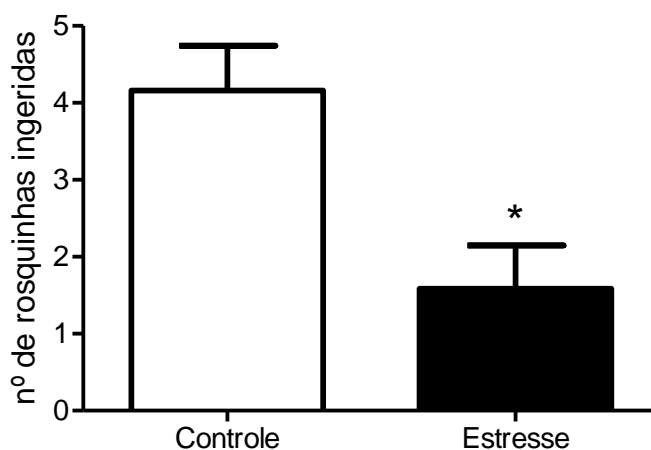


Figura 1 - Consumo de alimento palatável em animais expostos ao estresse crônico variado no estado alimentado e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ n=8).

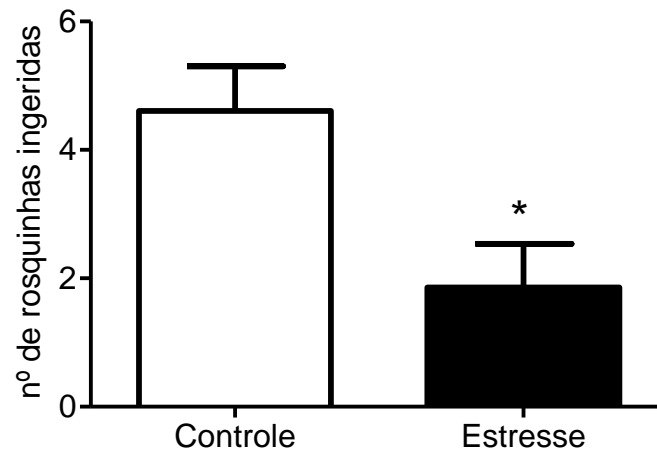


Figura 2 - Consumo de alimento palatável em animais expostos ao estresse crônico variado no estado jejum e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ $n=8$).

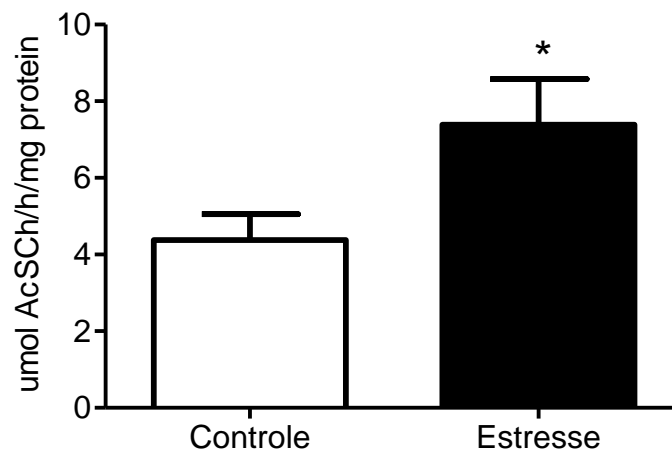


Figura 3 - Atividade da AChE em córtex de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ $n=8$). A Atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

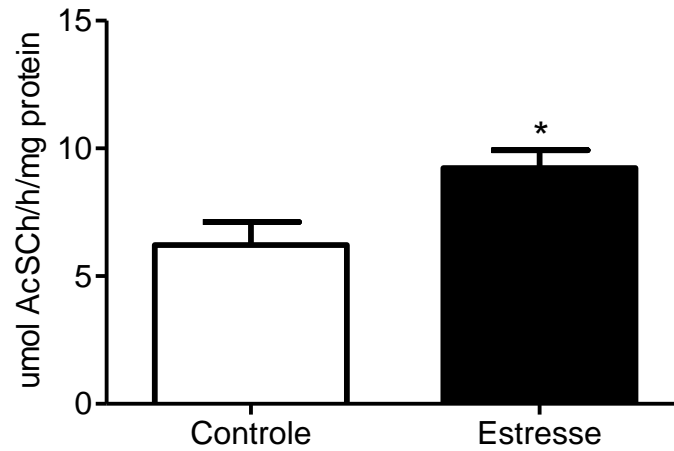


Figura 4 - Atividade da AChE em hipocampo de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ $n=8$). A Atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

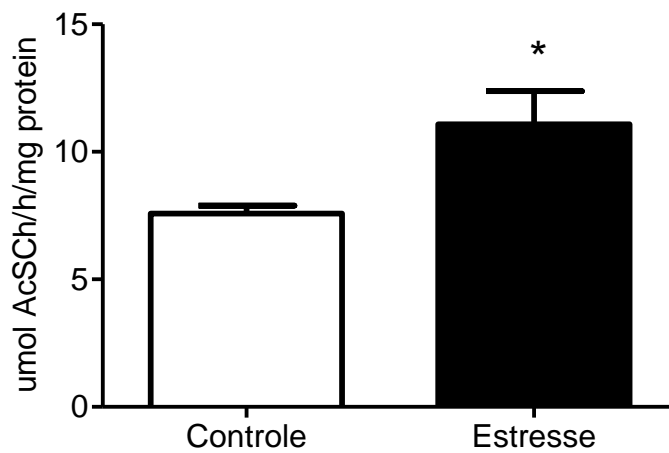


Figura 5 - Atividade da AChE em hipotálamo de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ $n=8$). A Atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

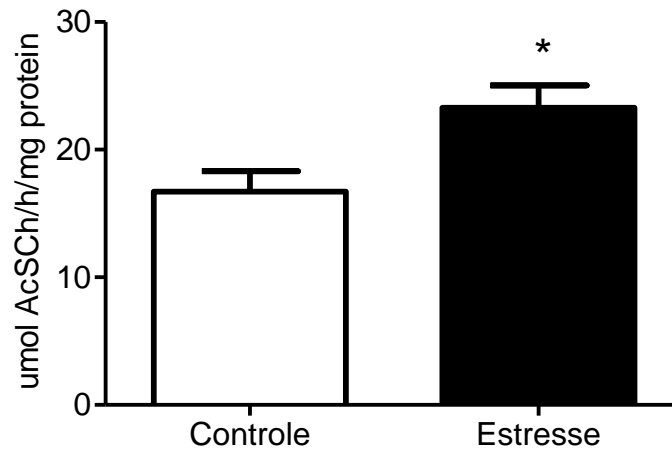


Figura 6 - Atividade da AChE em estriado de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. (*) representa diferença em relação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes, $P < 0,05$ $n=8$). A Atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

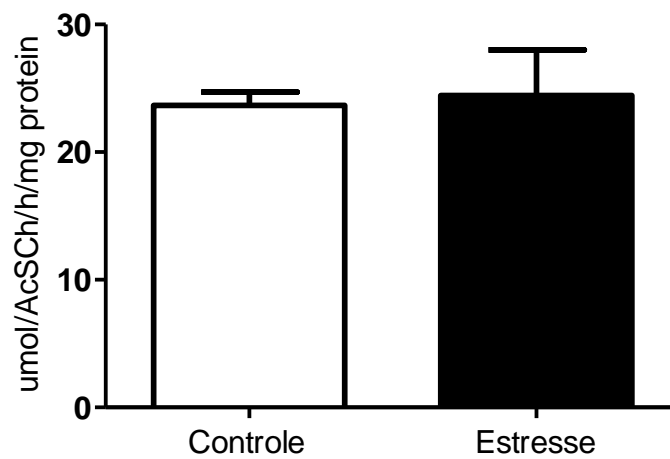


Figura 7 - Atividade da AChE em linfócitos de ratos expostos ao estresse crônico variado por 50 dias e grupo controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão (Teste t de Student para amostras independentes, $P > 0,05$ $n=8$). A Atividade da AChE é expressa em μmol de AcSch/h/mg de proteína.

5 Discussão

O presente estudo demonstra que a exposição ao ECV por 50 dias é capaz de alterar o comportamento alimentar, levando a diminuição do consumo de alimento palatável. Estes comportamentos caracterizam o estado de anedonia, sintoma comum da depressão, que é definido como a perda da capacidade de sentir prazer (WILLNER, 1997). Esses achados diferem daqueles onde são utilizados modelos de estresse crônico por imobilização, pois nestes casos os animais aumentam o consumo de alimento doce, devido ao papel ansiogênico do protocolo (ELY et al 1997; SILVEIRA et al 2000).

É descrito na literatura, que o protocolo de estresse crônico leva a um aumento na sensibilidade da neurotransmissão serotoninérgica, o que favorece o quadro ansiogênico (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Acredita-se que a ansiedade seja uma resposta adaptativa, mantida pela seleção natural, para que o mecanismo de luta e fuga seja atenuado em situações em que há uma adaptabilidade ao agente estressor (MARGIS et al, 2003). Além disso, a ansiedade promovida pelo estresse crônico pode ser revertida por antagonistas da neurotransmissão serotoninérgica e benzodiazepínicos (PINHEIRO et al, 2002; ELY et al, 1997). Diferentemente, o estresse crônico variado parece diminuir a neurotransmissão serotoninérgica, pois a exposição prolongada e imprevisível a agentes estressores leva a uma diminuição na função e número de receptores 5HT. Esse déficit na via serotoninérgica é um dos responsáveis pelo comportamento depressivo observado em modelos animais de estresse crônico variado, que pode ser revertido com o uso de antidepressivos tricíclicos e medicamentos que atuam na recaptação de serotonina e agonistas 5HT_{1A} (CHEN et al, 2013; WILLNER, et al, 1987). A diminuição da ingestão de Froot Loops® pode estar sofrendo influência da via serotoninérgica devido ao fato desta estar diretamente relacionada com a depressão. Além disso, Gamaro et al (2003) atribuíram a diminuição na ingestão de alimento palatável ao déficit na neurotransmissão dopaminérgica no hipotálamo, a qual tem papel na motivação para estímulos prazerosos no sistema de recompensa.

Além destes aspectos, os resultados demonstram um aumento significativo na atividade da enzima AChE em todas as estruturas encefálicas analisadas. Estes achados se assemelham ao observado em um trabalho anterior, onde foi observado um aumento na atividade da AChE no hipocampo dos animais (TAGLIARI, 2011). Neste sentido, o ECV poderia interferir na consolidação de memória e aprendizado de modelos animais. Esse efeito poderia ser atribuído ao aumento na atividade da AChE, visto que a acetilcolina é um dos neurotransmissores envolvidos no processamento cognitivo (DAS et al, 2000; SRIKUMAR; RAJU; SHANKARANARAYANA RAO, 2006). Além de sua função na cognição, acredita-se que a acetilcolina impede a formação do peptídeo β -amiloide, deste modo, um aumento na atividade da AChE poderia contribuir para o processo de degeneração do hipocampo e desenvolvimento dos sintomas da doença de Alzheimer, visto que o peptídeo β -amiloide é um dos principais envolvidos na patogenia desta demência (DHIKAV; ANAND, 2011). A partir desta lógica, situações de ECV, que são comuns no cotidiano da população, poderiam contribuir para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, associado à alimentação e fatores genéticos. Além disso, o ECV poderia propiciar o agravamento do quadro clínico daqueles indivíduos já acometidos por esta demência, porém mais estudos devem ser realizados para compreender melhor essa possível relação.

A acetilcolina também está envolvida em processos inflamatórios, sendo capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (WANG; ZHANG; TANG, 2010; GNATEK et al, 2012). Em estudos sobre processos inflamatórios em nível central, especificamente no hipocampo, foi observado aumento na atividade da AChE e de citocinas pró-inflamatórias após aplicação do protocolo de estresse crônico variado, o que leva à conclusão de que a diminuição de ACh é responsável, em partes, pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TAGLIARI et al, 2011). Desta maneira, avaliamos a atividade da AChE nos linfócitos dos animais para compreender se o ECV é capaz de alterar a função da AChE em nível periférico, porém não houve diferença significativa na atividade da enzima entre os grupos. Esse achado demonstra que este protocolo de ECV não exerce influência sobre os níveis periféricos de acetilcolina em relação à degradação enzimática.

6 Conclusão

A partir dos resultados obtidos pode-se constatar que o modelo experimental de ECV gerou um quadro de anedonia nos animais. Além disso, este protocolo foi capaz de aumentar a atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e estriado dos animais porém não alterou a atividade desta enzima em linfócitos. Esses dados sugerem que o ECV pode modular a sinalização colinérgica em diferentes tipos de células. Esses resultados podem contribuir para um melhor entendimento sobre as adaptações do organismo frente a agentes estressores,

Referências

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 97, p. 77-89, 1968.

CHEN, H.; JIN, Z.; ZHANG, L.; XUE, R. XU, X.; ZHAO, N.; QIU, Z.; WANG, X.; ZHANG, Y.; YANG, R. Antidepressant-Like Activity of YL-0919: A Novel Combined Selective Serotonin Reuptake Inhibitor and 5-HT_{1A} Receptor Agonist. **Plos One**, v. 8, n. 12, p.1-11, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

DANG, H.; SUN, L.; LIU, X.; PENG, B.; WANG, Q.; JIA, W.; CHEN, Y.; PAN, A.; XIAO, P. Preventive action of Kai Xin San aqueous extract on depressive-like symptoms and cognition deficit induced by chronic mild stress. **Experimental Biology and Medicine** v. 234, p. 785–793, 2009.

DAS, A.; KAPOOR, K.; SAYEERPRIYADARSHINI, A. T.; DIKSHIT, M.; PALIT, G.; NATH, C. Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 3, p. 213-217, 2000.

DE KLOET, E.R.; SUTANTO, W.; VAN DEN BERG, D.T.; CAREY, M.P.; VAN HAARST, A.D.; HORNSBY, C.D.; MEIJER O.C.; ROTS, N.Y.; OITZL, M.S. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, p. 183-190, dez. 1993.

DHIKAV, V.; ANAND, K. Potential Predictors of Hippocampal Atrophy in Alzheimer's Disease. **Drugs & Aging**. v. 28, n.1, p.1-11, 2011.

EINARSSON, S.; BRANDT, Y.; LUNDEHEIM, N.; MADEJ, A.; Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. **Acta Vet Scand.** v. 10, p. 48-50, 2008.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

ELY, D. R.; DAPPER, V.; MARASCA, J.; CORRÊA, J. B.; GAMARO, G. D.; XAVIER, M. H.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI, D.; ROSAT, R.; FERREIRA, M. B. C.; DALMAZ, C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiology & Behavior**, v. 61, p. 395-398, 1997.

FITZGERALD, B.B.; COSTA, L.G. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 20, p. 210-216, 1993.

FROGER, N.; PALAZZO, E.; BONI, C.; Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. **Journal Neuroscience**, v. 24, n.11, p. 2787-2796, 2004.

GAMARO, G. D.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI D. H.; XAVIER, M. H.; DALMAZ, C. Effect Of Repeated Restraint Stress On Memory In Different Tasks. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 341-347, 1999.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v. 42 p.107-114, 2003.

GAMARO, G. D.; PREDIGER, M.E.; LOPES, J.; BASSANI, M.G.; DALMAZ, C. Fluoxetine alters feeding behavior and leptin levels in chronically-stressed rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 90, p. 312–317, 2008.

GNATEK, Y.; ZIMMERMAN, G.; GOLL, Y.; NAJAMI, N.; SOREQ, H.; FRIEDMAN, A. Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis. **Molecular Neuroscience**, v. 5, p. 66, 2012.

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.

GRONLI, J.; MURISON, R.; FISKE, E. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. **Physiology Behavior**, v. 84, p. 571-577, 2003.

JOCA, S.R.J.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 46-51, 2003.

KATZ, R. J.; SIBEL, A. Animal model of depression: tests of three structurally and pharmacologically novel antidepressant compounds. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 973-977, 1982.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

LANZIOTTI, V. M. N.; BARROS, H. M. T.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. **Revista Pesquisa Medica**, v. 28, p. 26-30, 1994.

LIU, J.; WANG, X.; SHIGENAGA, M. K.; YEO, H. C.; MORI, A.; AMES, B. N. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. **FASEB Journal**, v. 10, p. 1532-1538, 1996.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A.F.; SILVEIRA, R.O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista Psiquiatria**, v. 24, p. 65-74, 2003.

MARTÍ, O.; GAVALDA, A.; JOLIN, T.; ARMÁRIO, A. Effect of regulatory of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n.1, p. 67-77, 1993.

MCEWEN, B. S.; CONRAD, C. D.; KURODA, Y.; FRANKFURT, M.; MAGARINOS, A. M.; MCKITTRICK, C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. **European Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. 323-328, 1997.

NIZRI, E.; ADANI, R.; MESHULAM, H.; AMITAL, G.; BRENNER, T. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential frugs for neuroinflammatory impairments. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 46-50, 2005.

PINHEIRO, G.A.; ALVES, S.H.S.; MURCE, P.P.; CRUZ, P.M. Envolvimento dos Receptores 5-HT₂ da Amígdala nos Níveis de Ansiedade Induzidos pela Exposição de Ratos ao Labirinto em Cruz Elevado. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 18, n. 3, p.239-335, 2002.

REARDON, C.; DUNCAN, G. S.; BRÜSTLE, A.; BRENNERA, D. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **PNAS**, v. 110, n. 4, p. 1410-1415, 2013.

ROCHA, J. B. T.; EMANUELLI, T.; PEREIRA, M. E. Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**. v. 53, p. 431-437, 1993.

ROZISKY, J.R.; DANTAS, G.; ADACHI, L.S.; ALVES, V.S.; FERREIRA, M. B. C.; SARKIS, J.J.; TORRES, I. L. S. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 6, p. 561-565, 2008.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32-36, 1936.

SILVEIRA, P.P.; XAVIER, M.H.; SOUZA, F.H.; MANOLI, L.P.; ROSAT, R.M.; FERREIRA M.B.C.; DALMAZ, C.;. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33 n. 11 p. 1343-1350, 2000.

SRIKUMAR, B.N; RAJU, T.R; SHANKARANARAYANA RAO, B.S. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats. **Neuroscience**, v. 143 p. 679-688, 2006.

TAGLIARI, B.; TAGLIARI, A.P.; SCHMITZ, F.; CUNHA, A.T.S.; DALMAZ, C.; WYSE, A.T.S. Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. **Springer Science+Business Media**, v.36, p.487-493, 2011.

TORRES, I. L.; GAMARO, G. D.; VASCONCELLOS, A. P.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic restraint stress on feeding behavior and monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry**, v. 27, p. 519-525, 2002.

TORRES, R. L.; TORRES, I. L. S.; GAMARO, G. D.; FONTELLA, F. U.; SILVEIRA, P. P.; MOREIRA, J. S. R.; LACERDA, M.; AMORETTI, J. R.; RECH, D.; DALMAZ, C.; BELLÓ, A. A. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lung of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 185-192, 2002.

WANG H. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384–388, 2003.

WANG, J.; ZHANG, H.Y.; TANG, X.C. Huper zinea improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. **Journal Neuroscience Research**, v. 88, p. 807–815, 2010.

WILLNER, P. The chronic mild stress model of depression: valid, reasonably reliable, and useful. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 371–377, 1997.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, jul. 2005.

WILLNER, P. TOWELL, A., SAMPSON, D., SOPHOKLEOUS, S., MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358-364, 1987.