



UFSM

Dissertação de Mestrado

**SENSIBILIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE
(E.C. 3.1.1.7) À NICOTINA *IN VITRO* E *IN VIVO***

Micheli Figueiró

PPGBTOX

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**SENSIBILIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE
(E.C. 3.1.1.7) À NICOTINA *IN VITRO* E *IN VIVO***

por

Micheli Figueiró

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre Em Bioquímica Toxicológica.**

PPGBTOX

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SENSIBILIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (E.C. 3.1.1.7)
À NICOTINA *IN VITRO* E *IN VIVO***

elaborada por

Micheli Figueiró

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Ester Pereira (Presidente/Orientadora)

Vera Maria Morsch

Marilise Escobar Burger

**“O valor de cada um é relacionado
com o valor das coisas
às quais deu importância”
(Marco Aurélio)**

**Dedico este trabalho, com todo meu amor,
aos MEUS PAIS Jair e Adriana.**

Agradecimentos:

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio, incentivo e acima de tudo pela confiança em minha vitória. Vamos juntos a mais uma etapa!

A Fabi, pela amizade, pelo MARAVILHOSO convívio que tivemos, pelos longos almoços no CCS!! E é claro, pela intensa dedicação ao meu trabalho que ela defendeu como se fosse seu. Obrigada pela *eficácia e eficiência!*

A Nilce “Berenice”, por enriquecer meu vocabulário e pela convivência amistosa que sempre tivemos.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos de descontração que nos faziam muito bem, afinal precisamos encarar a vida com humor.

Não poderia deixar de agradecer a minha orientadora, Ester. Muito obrigada pela chance de mostrar meu trabalho, por acreditar em mim, pelo aprendizado e desculpe-me por não ter sido a orientada perfeita.

Aos professores da pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para minha formação, em especial ao Prof. Carlos, pela atenção com que sempre me tratou.

Aos demais colegas de curso, pela amizade e compreensão, afinal estávamos no mesmo barco!

A CAPES, pela bolsa concedida.

E finalmente, quero agradecer àqueles que desejaram que este trabalho não se concretizasse, pois criaram obstáculos e estes foram ultrapassados. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tabaco	1
1.1.1. Histórico	1
1.1.2. Efeitos nocivos do fumo	1
1.2. Nicotina	2
1.2.1. Química da nicotina	2
1.2.2. Farmacocinética da nicotina	3
1.2.2.1. Absorção	3
1.2.2.2. Distribuição	3

1.2.2.3. Metabolismo e eliminação.....	4
1.2.3. Farmacodinâmica da nicotina	5
1.2.4. Tolerância	7
1.2.5. Efeitos benéficos da nicotina	7
1.3. Sistema Colinérgico	8
1.4. Colinesterases	10
1.5. Acetilcolinesterase	12
1.5.1. Estrutura da AChE	12
1.5.2. Mecanismo de ação da AChE.....	15
1.5.3. Inibição da AChE	17
2. OBJETIVOS	18
3. METODOLOGIA GERAL	19
4. RESULTADOS	24
4.1. Capítulo 1- Manuscrito.....	25
4.1.1. Abstract.....	26
4.1.2. Introduction	27
4.1.3. Material and Methods.....	29

4.1.3.1. Chemicals	29
4.1.3.2. Acetylcholinesterase assay	30
4.1.3.3. Sources enzyme and assay medium	30
4.1.3.4. Kinetic parameters	32
4.1.3.5. Protein determination	33
4.1.3.6. Statistical analysis	33
4.1.4. Results	33
4.1.5. Discussion	39
4.1.6. Acknowledgements	41
4.1.7. References	42
4.2. Capítulo 2- Manuscrito	46
4.2.1. Abstract	47
4.2.2. Introduction	48
4.2.3. Material and Methods	49
4.2.3.1. Chemicals	49
4.2.3.2. Tissue preparation	50
4.2.3.3. Acetylcholinesterase assay	50

4.2.3.4. Protein determination.....	51
4.2.3.5. Statistical analysis.....	51
4.2.4. Results.....	52
4.2.5. Discussion.....	57
4.2.6. References.....	60
4.3. Capítulo 3- Manuscrito.....	64
4.3.1. Resumo.....	65
4.3.2. Abstract.....	67
4.3.3. Introdução.....	69
4.3.4. Material e Métodos.....	71
4.3.5. Resultados.....	74
4.3.6. Discussão.....	82
4.3.7. Referências bibliográficas.....	85
5. DISCUSSÃO GERAL.....	89
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

ANOVA – análise de variância

ATC – acetiltiocolina

BuChE - butirilcolinesterase

ChE – colinesterase

DTNB – ácido 5-5-ditio-bis (2-nitrobenzóico)

E.C – Enzyme Commission (Comissão de Enzimas)

e.p. – erro padrão

IC₅₀ – concentração de inibidor que reduz a atividade enzimática a 50% da atividade original

i.p. - intraperitoneal

K_m – constante de Michaelis-Menten

PAS – sítio aniônico periférico

s.c. – subcutânea

SN – sistema nervoso

SNC – sistema nervoso central

V_{max} – velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

FIGURA 1.1. Estrutura da nicotina	2
FIGURA 1.2. Principais vias do metabolismo da nicotina.....	5
FIGURA 1.3. Estrutura química da acetilcolina	8
FIGURA 1.4. Vias da acetilcolina no cérebro	9
FIGURA 1.5. Variações conformacionais da ACh e reconhecimento molecular seletivo de seus grupamentos pelos receptores muscarínicos e nicotínicos	11
FIGURA 1.6. Formas moleculares da AChE	13
FIGURA 1.7. Visão do centro ativo da AChE de mamíferos.....	15
FIGURA 1.8. Mecanismo de ação da AChE.....	16

4.1. CAPÍTULO 1

FIG. 1. Effect of nicotine on the AChE activity from rat brain (A), blood (B) and purified of Electric Eel (C).	35
--	----

4.2. CAPÍTULO 2

FIGURE 1. Effect of nicotine on the AChE activity from cortex (A), striatum (B), hippocampus (C), hypothalamus (D), and cerebellum (E) of rats.....53

FIGURE 2. Michaelis-Menten plots of AChE activity from cortex (A) hypothalamus (B) and striatum (C) in the presence of nicotine (0–1 mM)....55

4.3. CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Atividade da AChE cerebral de ratas expostas agudamente à nicotina74

FIGURA 2. Atividade da ChE sérica de ratas expostas agudamente à nicotina75

FIGURA 3. Atividade da AChE cerebral de ratas expostas por 15 ou 30 dias à nicotina78

FIGURA 4. Atividade da ChE sérica de ratas expostas por 15 ou 30 dias à nicotina.79

FIGURA 5. Ganho de peso corporal de ratas expostas por 15 dias à nicotina80

FIGURA 6. Ganho de peso corporal de ratas expostas por 30 dias à nicotina.81

LISTA DE TABELAS

4.1. CAPÍTULO 1

Table 1. Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) of AChE in the presence of nicotine36

Table 2. Hydrolysis efficiency and IC_{50} values for AChE from rat brain, human whole and purified eel38

4.2. CAPÍTULO 2

Table 1. IC_{50} values for AChE from brain structures54

Table 2. Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) of AChE in the presence of nicotine56

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

SENSIBILIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (E.C. 3.1.1.7) À NICOTINA *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTORA: MICHELI FIGUEIRÓ

ORIENTADOR: MARIA ESTER PEREIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de Agosto de 2005.

Este trabalho avaliou a sensibilidade da enzima acetilcolinesterase de diferentes fontes e regiões cerebrais à nicotina *in vitro*, e os efeitos da exposição aguda e subcrônica ao alcalóide sobre as atividades da acetilcolinesterase cerebral e colinesterase sérica, ganho de peso corporal e peso cerebral de ratas.

As atividades enzimáticas foram determinadas segundo o método espectrofotométrico de Ellman (1961), utilizando-se acetiltiocolina como substrato. No estudo *in vitro*, os efeitos da nicotina foram analisados em concentrações que variaram de 0 a 1 mM do alcalóide e de 0 a 1 mM de substrato. Nos ensaios enzimáticos *ex vivo* foram utilizadas concentrações fixas de 0,8 mM de acetiltiocolina.

Os resultados referentes aos efeitos da nicotina *in vitro* demonstram que a atividade da enzima de cérebro de ratas, de sangue humano e purificada de órgão Elétrico de Enguia foi inibida competitivamente pelas menores concentrações de nicotina testadas. O efeito semelhante sobre as três fontes pode ser consequência da predominância da forma molecular G4 da enzima. A atividade da acetilcolinesterase das estruturas cerebrais: córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo, mostrou-se inibida pela nicotina. De acordo com o IC₅₀, o efeito inibitório foi similar entre as estruturas, embora a enzima de

estriado e córtex tenha sido mais sensível e a de hipotálamo menos sensível ao alcalóide. As constantes cinéticas calculadas de acordo com o método de Michaelis-Menten para estriado, córtex e hipotálamo demonstraram que a nicotina induz um aumento de K_m e diminuição de V_{max} . Estes resultados revelam que o aumento da concentração de substrato não foi suficiente para recuperar a velocidade da reação, mesmo na presença das menores concentrações de nicotina.

Os efeitos da nicotina *ex vivo* foram investigados administrando-se o alcalóide aguda ou subcronicamente. Ratas Wistar com 30 dias de idade receberam uma dose de 0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg (i.p.) de nicotina (exposição aguda) e após 10 minutos foram anestesiadas e mortas por decapitação. O cérebro foi removido e homogeneizado, o sangue coletado e ambos submetidos à centrifugação a fim de obter-se a fração S1 e soro, respectivamente. Na exposição subcrônica, ratas Wistar de 30 dias receberam doses de 0, 0,5 ou 1,0 mg/kg (s.c.) de nicotina por 15 ou 30 dias, 2 vezes ao dia (0, 1,0 ou 2,0 mg/kg/dia). Os animais foram pesados a cada 2 dias e 12 horas após a administração da última dose foram sacrificados. O cérebro e o sangue foram preparados como descrito anteriormente. Os resultados demonstram que as atividades da AChE cerebral e ChE sérica não se apresentaram modificadas pela exposição aguda ou subcrônica (15 ou 30 dias) à nicotina. O ganho de peso corporal e o peso cerebral também não foram alterados pela exposição ao alcalóide.

A ausência de efeitos da nicotina sobre as atividades enzimáticas *ex vivo* pode estar relacionada pelo menos a duas hipóteses: níveis baixos de nicotina atingidos *in vivo*; ou uma possível inibição enzimática presente *in vivo* induzida pelos tratamentos, mas não aparente devido ao

excesso de substrato ensaiado *ex vivo*, uma vez que o efeito inibitório da nicotina sobre a AChE *in vitro* possui um componente competitivo.

Palavras-chaves: nicotina; acetilcolinesterase; exposição aguda e subcrônica; parâmetros cinéticos; peso corporal; peso cerebral.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

SENSIBILIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE (E.C. 3.1.1.7) À NICOTINA *IN VITRO* E *IN VIVO*

[Sensitivity of the acetylcholinesterase enzyme (E.C. 3.1.1.7) at nicotine *in vitro*
and *in vivo*]

AUTORA: MICHELI FIGUEIRÓ

ORIENTADOR: MARIA ESTER PEREIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de Agosto de 2005.

This work valued the sensibility of the acetylcholinesterase from different sources and brain regions at nicotine *in vitro*, and the effects of the acute and subchronic exposures at the alkaloid on the brain acetylcholinesterase and serum cholinesterase activities, body weight gain and cerebral weight of female rats.

The activity of cholinesterases was determined by spectrophotometric method of Ellman (1961), using acetylthiocholine as substrate. In the nicotine *in vitro* study, the enzymatic analysis was performed with nicotine concentrations ranging from 0 to 1 mM and substrate concentration of 0 -1 mM. In the *ex vivo* enzymatic assay, 0.8 mM of acetylthiocholine was used.

The results regarding at the effects of the nicotine *in vitro* demonstrated that the enzyme activity from rat brain, human blood and purified of Electric Eel was competitively inhibited by lower nicotine concentrations. The similar effect may be due to the predominance of the G4 molecular globular form in these three sources. The

acetylcholinesterase activity from brain structures: cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus and cerebellum, was inhibited by nicotine. Considering the IC_{50} , the inhibitory effect was similar among the structures, although the striatum and cortex enzyme seems to be more sensitive, whereas the hypothalamus seems to be less sensitive to alkaloid. The kinetics constants calculated by Michaelis-Menten methods for striatum, cortex and hypothalamus demonstrated that the nicotine induce an increase of K_m and a decrease of V_{max} . These results showed that the increase of the substrate concentration was not enough for to reach the original V_{max} (absence of inhibitor), even in the presence of the low nicotine concentrations.

The effects of *ex vivo* nicotine exposure were investigated after acute or subchronic alkaloid administration. Female Wistar rats with 30 days old received one dose of 0, 0.5, 1 or 5 mg/kg (i.p.) of nicotine (acute exposure) and 10 minutes later were anesthetized and killed by decapitation. Brain was removed and homogenized, the blood was collected and both centrifuged for obtain the S1 fraction and serum, respectively. In the subchronic exposure, female Wistar rats of 30 days old received doses of 0, 0.5 or 1.0 mg/kg (s.c.) of nicotine for 15 or 30 days, administered twice a day (0, 1 or 2 mg/kg/day). The animals were weighed every two days and killed 12 h after the last injection. The brain and the blood were prepared as previously described. The results demonstrated that the cerebral AChE and serum ChE activities were not changed by acute or subchronic exposure (15 or 30 days) at nicotine. The body weight gain and the cerebral weight also were not altered by alkaloid exposure.

The absence of effect on the enzymatic activities *ex vivo* may be related at least the two possibilities: low levels of nicotine reached *in vivo*; or a possible enzymatic inhibition present *in vivo* induced by treatments

but not apparent due to substrate excess assayed *ex vivo*, since the *in vitro* inhibitory effect of the nicotine on the AChE presents an competitive component.

Key words: nicotine; acetylcholinesterase; acute and subchronic exposure; kinetics parameters; body weight; cerebral weight.

1. INTRODUÇÃO:

1.1. TABACO

1.1.1. Histórico:

Os índios das Américas do Norte e do Sul, foram os primeiros a cultivar e a usar o tabaco para fins medicinais e cerimoniais. O hábito de fumar se espalhou pelo mundo, inicialmente através da França em 1556 quando Jean Nicot, o embaixador daquele país em Portugal e em cuja homenagem se deu o nome ao gênero da planta, enviou sementes de *Nicotiana tabacum* à sua rainha, Catarina de Médici. Foi em seguida introduzido em Portugal (1558) e na Inglaterra (1565), só chegando ao Brasil em 1600 (WEINTRAUB, 1977).

1.1.2. Efeitos nocivos do fumo:

Fumar é, por uma grande margem, a causa mais prevalente de morte de adultos no mundo: 1 em 10 mortes. Em 1990, o fumo foi responsável por 10% das mortes; e estima-se, para 2030 um aumento para 17% , em decorrência do crescimento do uso de cigarro na Ásia, África e América Latina (PETO *et al. apud* RANG *et al.*, 2004).

O ato de fumar está diretamente ligado com a alta incidência de: câncer de pulmão; doenças respiratórias, como a bronquite crônica e o enfisema pulmonar; doenças cardiovasculares, como a aterosclerose coronária e hipertensão arterial; câncer da cavidade oral, laringe e esôfago; recém-nascidos prematuros e de baixo peso; além de moléstias não-cancerosas da boca. Apesar de conhecerem os efeitos adversos do cigarro, milhões de pessoas são viciadas e continuam a fumar (RANG *et al.*,2004).

Quimicamente, o cigarro é constituído por várias substâncias tóxicas. Entre as mais importantes podem-se distinguir os seguintes grupos: substâncias nitrogenadas, hidratos de carbono, substâncias minerais, óleos etéreos e resinas, alcatrão, corantes, polifenóis, etc (ROSEMBERG, 1999).

Em 1988, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, baseado no conceito apresentado pela Organização Mundial da Saúde, relatou as conseqüências de fumar para saúde e concluiu definitivamente que cigarros e outros produtos são viciantes e que a nicotina é a grande responsável pelo vício (RANG *et al.*, 2004)

1.2. NICOTINA

A nicotina é o principal agente farmacologicamente ativo do tabaco responsável pelo comportamento viciante (SOHN *et al.*, 2003). É uma droga lícita que ocorre naturalmente nas plantas da família das solanoceous, principalmente na espécie *Nicotiana tabacum*.

1.2.1. Química da nicotina:

A nicotina [1-metil-2-(3-piridil-pirrolidina), C₁₀H₁₄N₂] (Figura 1.1) é uma amina terciária consistindo de um anel piridina e outro de pirrolidina. Há dois estereoisômeros da nicotina: o isômero ativo (*S*)-nicotina, presente no tabaco e que se liga aos receptores colinérgicos nicotínicos; e a (*R*)-nicotina que é somente um fraco agonista dos receptores colinérgicos. Durante o ato de fumar, uma racemirização ocorre, expondo o fumante a pequenas quantidades de (*R*)-nicotina (ZEVIN *et al.*, 1998).

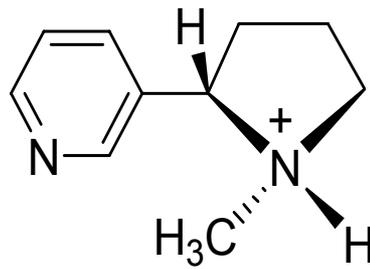


Figura 1.1. Estrutura da nicotina.

1.2.2. Farmacocinética da nicotina:

1.2.2.1. Absorção:

A nicotina é uma base fraca ($pK_a = 8,5$); conseqüentemente, seu movimento através das membranas biológicas depende do seu pH. O pH da fumaça do tabaco utilizado em muitos cigarros é ácido (5,5-6). Nesta faixa de pH, a nicotina é quase que completamente ionizada, e assim não consegue atravessar facilmente as membranas biológicas, o que significa que ela é mal-absorvida pela mucosa bucal. Já o cachimbo e o charuto são confeccionados com um tipo de tabaco cujo pH da fumaça é alcalino (acima de 8,5). Neste pH, a nicotina não se ioniza e é então perfeitamente absorvida pela mucosa bucal (ZEVIN *et al.*, 1998).

Contudo, quando a fumaça aspirada do cigarro alcança os pulmões, a nicotina é rapidamente absorvida devido a grande superfície dos alvéolos pulmonares e ao alto pH do fluido pulmonar (aproximadamente 7,4) comparado com a mucosa bucal. Depois de absorvida, a nicotina entra na circulação e é distribuída para diferentes tecidos, incluindo o cérebro (ZEVIN *et al.*, 1998; SOHN *et al.*, 2003).

1.2.2.2. Distribuição:

A absorção pulmonar da fumaça do cigarro distribui a nicotina muito mais rapidamente do que qualquer outro método de distribuição no corpo humano. As drogas de uma maneira geral, são consideradas mais “pesadas” quando há uma entrega rápida ao cérebro. A nicotina aspirada pelo cigarro entra no sangue quase tão rapidamente quanto aquela injetada intravenosamente (SOHN *et al.*, 2003). O efeito rápido da nicotina sobre o cérebro (leva de 10 a 20 segundos para atingi-lo) é o principal determinante para a força da recompensa psicoativa causada pela droga (ZEVIN *et al.*, 1998).

1.2.2.3. Metabolismo e eliminação:

A meia-vida de eliminação da nicotina é em média de 2 a 3 horas. Ela sofre um extenso metabolismo, primeiramente no fígado, mas também em pequeno grau nos pulmões e cérebro. Aproximadamente 70-80% da nicotina é metabolizada a cotinina, um metabólito cetônico inativo, via C-oxidação, e outros 4% são metabolizados a nicotina *N*-óxido via N-oxidação (BENOWITZ *et al.*, 1994 *apud* SOHN *et al.*, 2003) (Figura 1.2). Há uma considerável variabilidade interindividual no metabolismo da nicotina a cotinina, principalmente étnica/racial (BENOWITZ, 1996).

A eliminação renal da nicotina é responsável por 2 a 35% da eliminação total do alcalóide (BENOWITZ *et al.*, 1985 *apud* SOHN *et al.*, 2003). O pH da urina afeta a excreção da nicotina por causa do seu efeito sobre o processo de ionização da nicotina; conseqüentemente, a eliminação renal aumenta com a acidez da urina e diminui com a alcalinidade da mesma (ZEVIN *et al.*, 1998).

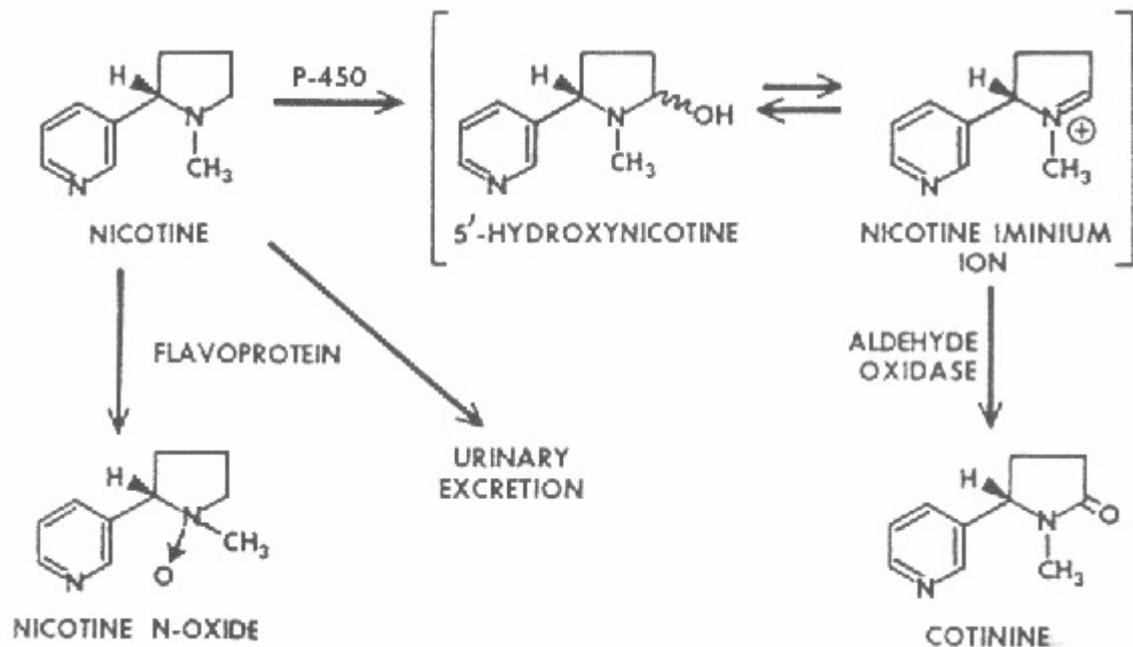


Figura 1.2. Principais vias do metabolismo da nicotina (Adaptado de: ZEVIN *et al.*, 1998).

1.2.3. Farmacodinâmica da nicotina:

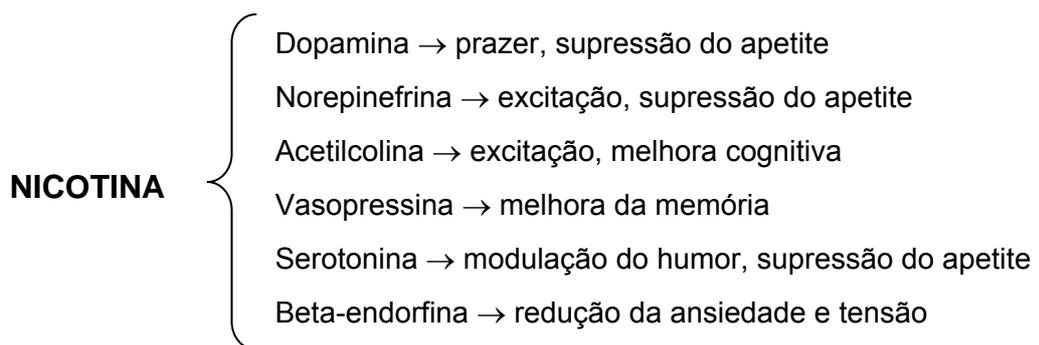
A nicotina é uma droga psicoativa e possui inúmeros efeitos sobre o humor e a função cognitiva. Segundo Benowitz (1999), o fumante apresenta sensações positivas tais como prazer, excitação e relaxamento. Fumar pode melhorar a atenção e aliviar estados emocionais adversos (redução da ansiedade e do estresse).

Ela atua através dos receptores colinérgicos nicotínicos que são encontrados no cérebro, gânglios autonômicos, e na junção neuromuscular. Os receptores nicotínicos são encontrados em diversas regiões do cérebro havendo diferentes sensibilidades e ações farmacológicas a vários agonistas (MCGEHEE & ROLE, 1995 *apud* ILBÄCK & STÅLHANDSKE, 2003). A variação na estrutura e função

destes receptores ajudam a esclarecer a diversidade dos efeitos da nicotina (ZEVIN *et al.*, 1998).

Quando a nicotina se liga ao seu receptor, há mudanças alostéricas nas subunidades dos receptores resultando em um estado ativado com a abertura do canal iônico, e subseqüentemente um estado de dessensibilização com o fechamento do canal (LENA & CHANGEUX *apud* ZEVIN *et al.*, 1998).

A ativação do receptor nicotínico causa a liberação de neurotransmissores, incluindo acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina, beta endorfina, glutamato, e outros (ZEVIN *et al.*, 1998). Os neurotransmissores liberados pela nicotina e seus efeitos comportamentais associados a esta liberação são apresentados abaixo:



Quando o fumante é exposto a doses muito baixas, a nicotina causa ativação simpática primeiramente através da ativação de quimiorreceptores ou através do efeito direto sobre o cérebro, com um aumento resultante nos batimentos cardíacos e pressão sangüínea. Com doses elevadas, a nicotina atua diretamente sobre o sistema neural periférico produzindo estimulação ganglionar e liberação de catecolaminas das adrenais. Se a dose for muito alta, a nicotina causa hipotensão e bradicardia como resultado do bloqueio ganglionar e possivelmente estimulação vagal além de efeitos depressores diretos

através de ações no cérebro (ZEVIN *et al.*, 1998). Existem ainda relatos de que a nicotina possa induzir efeitos inibitórios sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase. Chang *et al.*, (1973) demonstraram que após exposição crônica de ratos a nicotina por um período de oito semanas há uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase de algumas regiões cerebrais. A redução desta atividade foi ainda maior quando o tratamento estendeu-se por dezesseis semanas

1.2.4. Tolerância:

O termo tolerância é utilizado de modo convencional para descrever uma redução gradual na resposta farmacológica a uma substância (RANG *et al.*, 2004). O desenvolvimento da tolerância à nicotina se dá quando repetidas doses do alcalóide produzem menos efeito do que a primeira dose, ou que depois de repetidas exposições, a mesma concentração plasmática não produz o mesmo efeito comparado àquele inicial. A tolerância à nicotina manifesta-se pela ausência de náuseas, tonturas, e outros sintomas característicos ainda que usando quantidades substanciais de nicotina (ZEVIN *et al.*, 1998).

1.2.5. Efeitos benéficos da nicotina:

Apesar da nicotina estar relacionada a vários tipos de doenças inclusive na morte de milhões de pessoas, existe a possibilidade de que ela também possa ser usada na proteção contra inúmeras doenças (YILDIZ, 2004). Tem sido demonstrado que a doença de Parkinson se desenvolve com menor frequência em fumantes. O mesmo pode se aplicar à doença de Alzheimer, embora estes dados permaneçam controversos. Ainda, fatores genéticos podem estar por trás da conduta do ato de fumar e na susceptibilidade a estas doenças (RANG *et al.*, 2004).

1.3. SISTEMA COLINÉRGICO

A acetilcolina (ACh) (Figura 1.3) é o neurotransmissor endógeno das sinapses e junções neuroefetoras colinérgicas dos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP). É um dos mais importantes transmissores autonômicos fundamental para a compreensão da farmacologia deste sistema (BROWN & TAYLOR, 1996; RANG *et al.*, 2004).

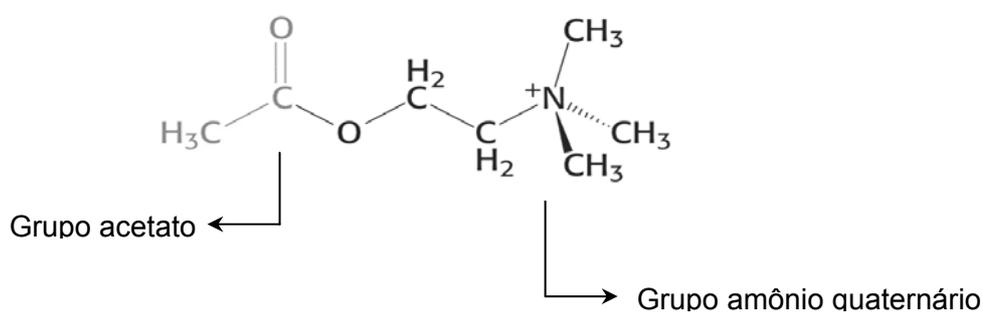


Figura 1.3. Estrutura química da acetilcolina.

A ACh é amplamente distribuída no cérebro. Possui efeitos principalmente excitatórios, que são efetivados pelos chamados receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (RANG *et al.*, 2004). Algumas das principais vias colinérgicas cerebrais estão na Figura 1.4

Os receptores muscarínicos no cérebro atuam ao nível pré-sináptico e muitos dos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores. Os receptores nicotínicos também estão disseminados no cérebro, porém de modo muito mais esparsos do que os receptores muscarínicos. Os receptores nicotínicos de ACh exibem, em sua maioria, localização pré-sináptica e atuam ao facilitar a liberação de outros transmissores como glutamato e dopamina, embora atuem pós-sinápticamente em algumas situações (RANG *et al.*, 2004). Há uma grande diversidade de receptores

colinérgicos nicotínicos, o que pode explicar os múltiplos efeitos da nicotina em humanos. Esta diversidade pode também apresentar diferentes alvos para terapias com agonistas ou antagonistas específicos (BENOWITZ, 1996).

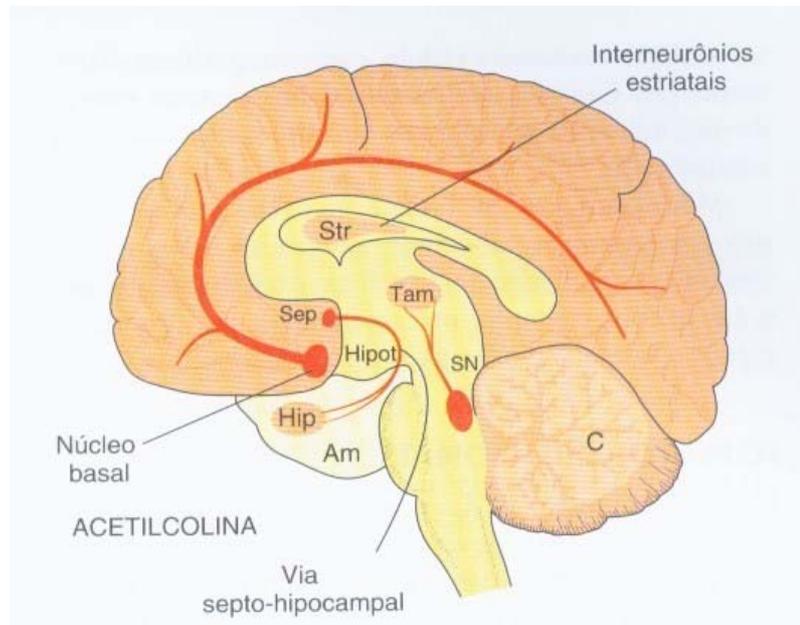


Figura 1.4. Vias da acetilcolina no cérebro. As localizações dos principais grupos de corpos celulares e tratos de fibras são mostrados em vermelho. (Am, núcleo amigdalóide; C, cerebelo; Hip, hipocampo; Hipot, hipotálamo; Sep, septo; SN, substância negra; Str, corpo estriado; Tam, tálamo). (Adaptado de: RANG *et al.*, 2004).

Como a ACh é uma molécula flexível, e evidências indiretas sugerem que as conformações deste neurotransmissor sejam diferentes quando ele estiver ligado aos receptores nicotínicos ou muscarínicos, é possível evidenciar que a conformação *antiperiplanar* da ACh está envolvida na interação com os receptores muscarínicos, enquanto que a conformação *sinclinal* da ACh é a responsável pelo reconhecimento

molecular do subtipo nicotínico (Figura 1.5) (BARREIRO & FRAGA, 2001). Desta forma é possível observar a similaridade estrutural entre o neurotransmissor ACh e os principais agonistas dos seus receptores (muscarina e nicotina).

1.4. COLINESTERASES

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos. São classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidade a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

Considera-se que as colinesterases constituam uma família de enzimas, que podem se subdividir em dois tipos principais: a acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7), que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a acetilcolina), e a butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8), que prefere hidrolisar outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas colinesterases são amplamente distribuídas por todo o corpo (TAYLOR & BROWN, 1999). O tipo de colinesterase encontrado em um tecido é freqüentemente um reflexo do tipo de tecido, sendo, portanto, um ponto distintivo entre as colinesterases. Em geral, os tecidos neurais expressam AChE, enquanto os tecidos não-neurais expressam BuChE (MASSOULIÉ *et al.*, 1982; AMITAI *et al.*, 1998). Porém, isto é uma generalização, e alguns tecidos neurais (gânglio autonômico), assim como alguns órgãos extraneurais (fígado, pulmões e pele) expressam ambas as esterases (LÀNG & KUFCSÁK, 1997).

Embora a BuChE esteja localizada no sistema nervoso (SN) durante o desenvolvimento, esta enzima não é essencial para a função deste. Já

a AChE, é extremamente importante para uma resposta colinérgica satisfatória (TAYLOR & BROWN, 1999).

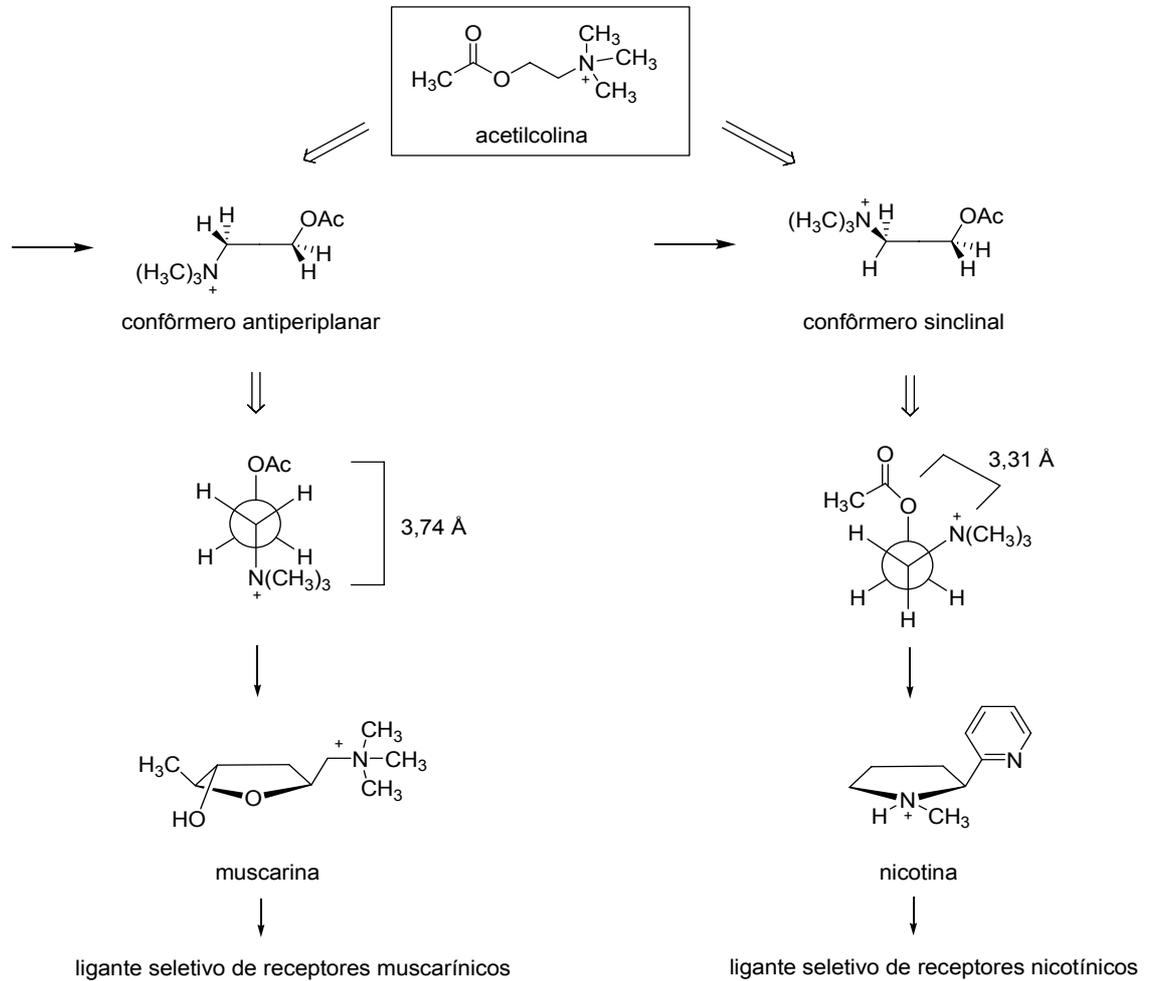


Figura 1.5. Variações conformacionais da acetilcolina e reconhecimento molecular seletivo de seus grupamentos pelos receptores muscarínicos e nicotínicos (Adaptado de: BARREIRO & FRAGA, 2001).

1.5. ACETILCOLINESTERASE

Em 1914, Dale investigou detalhadamente as propriedades farmacológicas da ACh. Ele observou a duração breve da ação dessa substância química e propôs que uma esterase dos tecidos degradaria rapidamente a ACh em ácido acético e colina, interrompendo desta forma sua ação (RANG *et al.*, 2004). A esterase em questão é a AChE, uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (MASSOULIÉ *et al.*, 1996). A hidrólise do neurotransmissor ACh no SN é conhecida por ser uma das reações catalíticas enzimáticas mais eficientes (NUNES-TAVARES *et al.*, 2002).

1.5.1. Estrutura da AChE:

A AChE existe como duas classes gerais de formas moleculares, que diferem quanto à solubilidade, modo de ligação e atividade catalítica (Figura 1.6): **1)** oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas que aparecem como monômeros, dímeros ou tetrâmeros, dando origem às formas globulares (G): G1, G2 e G4; **2)** associações heteroméricas de subunidades catalíticas com subunidades estruturais, onde a ligação de uma cauda de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A4, A8 e A12 da AChE (MASSOULIÉ *et al.*, 1993; TAYLOR & BROWN, 1999).

As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, presumivelmente com o intuito de exportação, ou associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídio acoplado (TAYLOR & BROWN, 1999). As formas assimétricas são encontradas associadas com a lâmina basal e são particularmente abundantes na junção neuromuscular (TAYLOR & BROWN, 1999). As diferenças nos arranjos

das subunidades levam a uma localização distinta da AChE sobre a superfície da célula, mas parece não afetar as atividades catalíticas intrínsecas das formas individuais (MASSOULIÉ *et al.*, 1996).

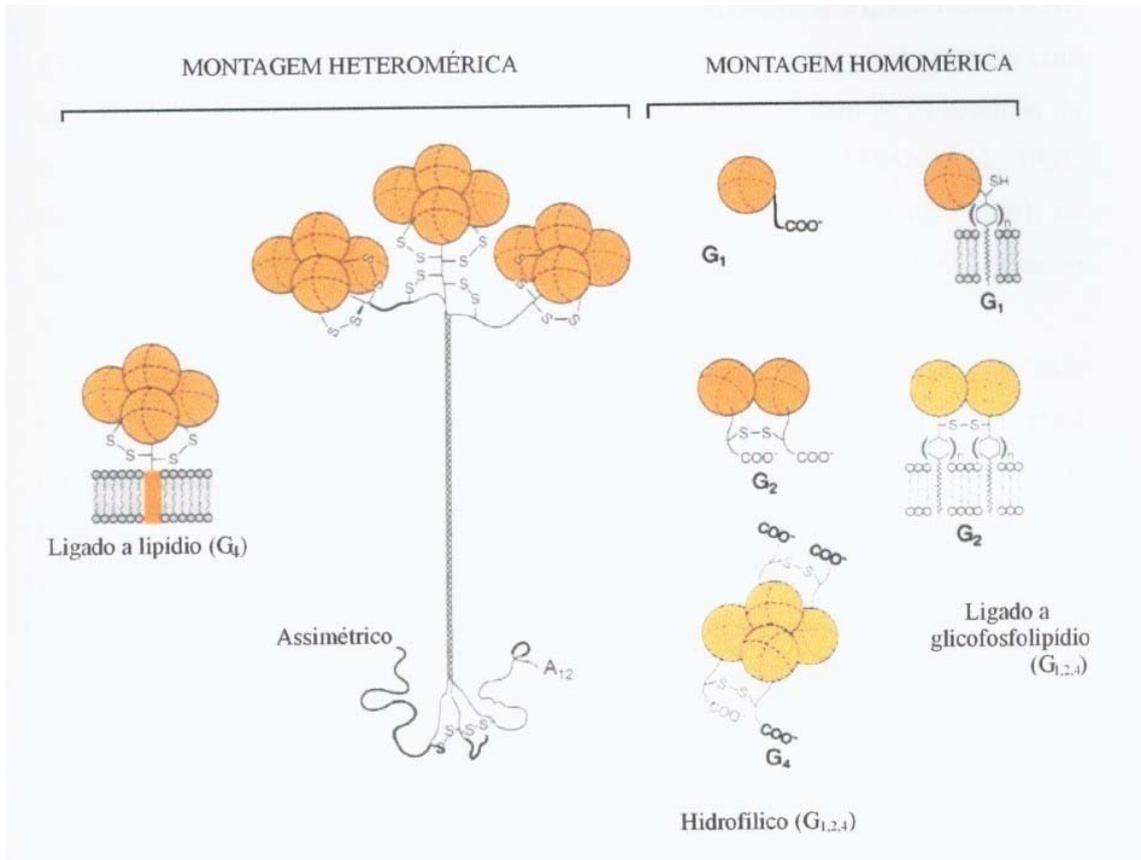


Figura 1.6. Formas moleculares da AChE (Adaptado de: SIEGEL *et al.*, 1999).

A maioria da AChE encontrada em tecido nervoso é do tipo globular, principalmente G₄, ligada à membrana (BRIMIJOIN, 1979; MASSOULIÉ *et al.*, 1993). Em sangue humano, a AChE é encontrada tanto nos eritrócitos quanto no plasma, onde predominam as formas G₂ e G₄ respectivamente (SKAU, 1985). A AChE purificada de órgão elétrico de

enguia, apresenta principalmente as formas G2 e G4, além da forma assimétrica A12 em menor quantidade (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A estrutura tridimensional da AChE demonstra que seu centro ativo é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina, histidina e glutamato (Figura 1.7). A visão tradicional do sítio ativo da AChE mostra dois subsítios; um sítio carregado negativamente ou “aniônico”, ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, que aloja o grupamento éster e carbonila da AChE (NACHMANSOHN & WILSON, 1951; TAYLOR & BROWN, 1999).

Um segundo sítio “aniônico”, que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic sites – PAS), foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. O papel fisiológico primário do PAS é acelerar a hidrólise da ACh com baixas concentrações de substrato (MALLENDER *et al.*, 1999; SZEGLITS *et al.*, 1999). Recentemente, tem sido sugerido que esse sítio possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou ainda na inibição por excesso de substrato (NUNES-TAVARES *et al.*, 2002).

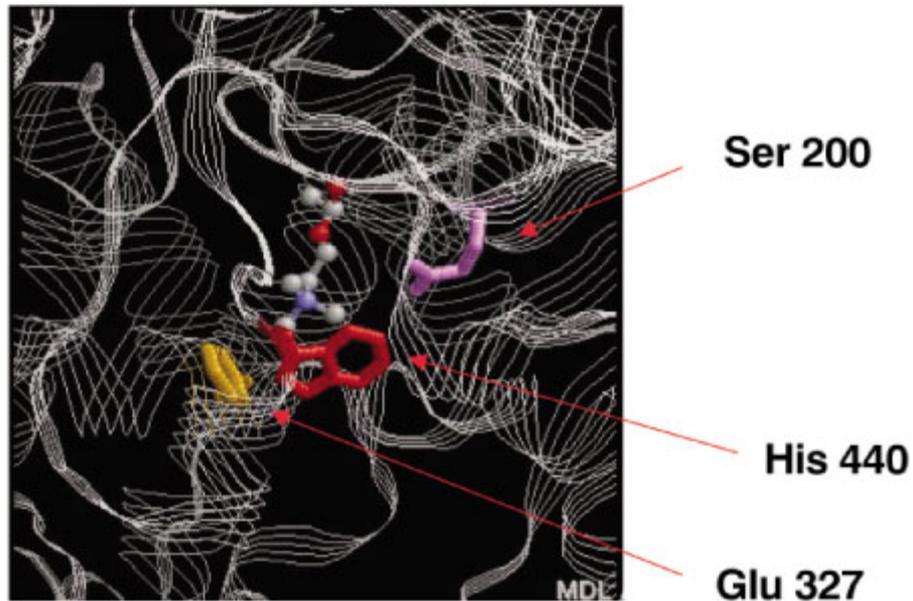


Figura 1.7. Visão do centro ativo da AChE de mamíferos. (Adaptado de: FRAGA & BARREIRO, 2004).

1.5.2. Mecanismo de ação da AChE:

O mecanismo catalítico da AChE (Figura 1.8) assemelha-se a de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de carga que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazol da histidina e a hidroxila da serina (TAYLOR, 1996).

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster-carbonila do substrato, promovendo a quebra da ligação éster. Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster, que se rompe e forma um conjugado acetil-enzima, com liberação concomitante da colina. O complexo acetil-enzima é passível de hidrólise e essa resulta na formação do acetato e da

enzima ativa (FROEDE & WILSON *apud* TAYLOR, 1996). Dessa forma, a enzima é totalmente regenerada.

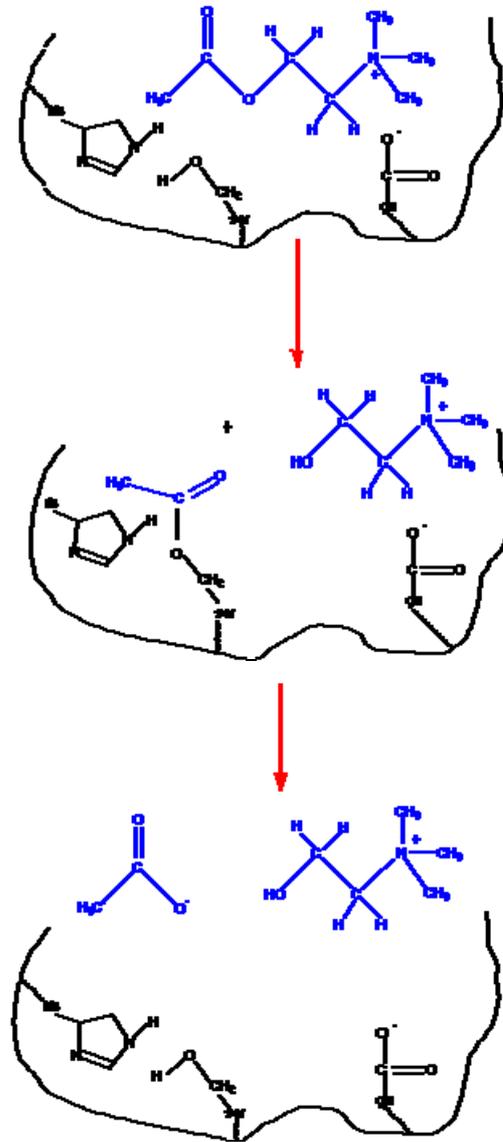


Figura 1.8. Mecanismo de ação da AChE.

1.5.3. Inibição da AChE:

Três domínios distintos na acetilcolinesterase constituem os locais de ligação para inibidores: o bolsão acil do centro ativo, o subsítio colina do centro ativo e o sítio aniônico periférico (TAYLOR & RADIC *apud* TAYLOR, 1996).

Alguns inibidores da AChE são usados terapeuticamente (fisostigmina e neostigmina, por exemplo), enquanto outros têm demonstrado uso como inseticidas. Inibidores, como o edrofônio, ligam-se reversivelmente ao sítio ativo da enzima e previnem o acesso do substrato. Outros inibidores reversíveis, como a galamina, propídio e a fasciculina, ligam-se ao sítio periférico da enzima (TAYLOR & BROWN, 1999).

Os efeitos farmacológicos característicos da inibição da AChE devem-se, basicamente, à prevenção da hidrólise da ACh pela AChE em locais de transmissão colinérgica. O neurotransmissor, assim, se acumula e a resposta a ACh liberada pelos impulsos colinérgicos ou espontaneamente liberada da terminação nervosa fica exacerbada (TAYLOR, 1996). Assim, os inibidores da AChE podem produzir os seguintes efeitos: **(1)** estímulo de respostas nos receptores muscarínicos nos órgãos efetores autônomos; **(2)** estímulo, seguido de depressão ou paralisia, de todos os gânglios autonômicos e musculatura esquelética (ações nicotínicas); e **(3)** estímulo, com uma ocasional depressão subsequente, de receptores colinérgicos no SNC (TAYLOR, 1996).

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral:

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da nicotina sobre a atividade da enzima AChE de diferentes fontes e regiões cerebrais de ratos *in vitro*, bem como os possíveis efeitos da exposição de ratos ao alcalóide *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos:

1. Verificar a sensibilidade da AChE de cérebro de ratas Wistar, de sangue humano e purificada de órgão elétrico de Enguia à nicotina;
2. Avaliar o efeito da nicotina sobre alguns parâmetros cinéticos da AChE, como K_m , V_{max} , EH e IC_{50} , nas fontes acima citadas;
3. Verificar os efeitos do alcalóide sobre a atividade da AChE de diferentes regiões do cérebro de ratas Wistar, como córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo;
4. Determinar, para as estruturas cerebrais de maior e menor sensibilidade à nicotina, parâmetros cinéticos como, K_m , V_{max} e IC_{50} ;
5. Determinar os possíveis efeitos da exposição aguda e subcrônica a nicotina sobre a atividade da AChE cerebral e colinesterase sérica em ratas Wistar adolescentes, observando alterações no ganho de peso corporal e peso cerebral.

3. METODOLOGIA GERAL

3.1. Material e Métodos:

3.1.1. Material

Acetiltiocolina (ATC), ácido 5,5-ditiobisnitrobenzóico (DTNB), Tris - (hidroximetil) – aminometano, enzima purificada de órgão elétrico de enguia (C-2888) e Coomassie brilhante azul G foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Albumina sérica bovina (fração V) (BSA), NaCl, K₂HPO₄ e KH₂PO₄ foram obtidos da Reagen (Brasil). A nicotina foi adquirida da Aldrich (Alemanha). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2. Material Biológico*

Como fontes de material biológico foram utilizados:

- a)** cérebro e soro de ratas Wistar;
- b)** amostras de sangue de doadores saudáveis não fumantes;
- c)** enzima purificada de órgão elétrico de enguia (C-2888, Sigma®).

* este trabalho foi submetido à avaliação do Comitê de Ética e Bem-estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, RS e aprovado sob Registro nº : 23081.014035/2004-49.

3.1.3. Preparação do material biológico

3.1.3.1. Cérebro:

Ratas Wistar (entre 30 e 90 dias de idade, conforme o experimento) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, foram anestesiadas e decapitadas. O cérebro foi dissecado, pesado e homogeneizado em 10 volumes de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, contendo sacarose 160 mM. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 1.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante obtido (fração S1) foi armazenado a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos. O mesmo protocolo foi seguido para a preparação das estruturas cerebrais, onde estriado e hipocampo foram homogeneizados em 20 volumes e hipotálamo, cerebelo e córtex em 10 volumes do tampão já citado. Os homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 1.000 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante (fração S1) obtido armazenado a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

3.1.3.2. Soro

Amostras de sangue de ratas foram coletadas por decapitação e submetidas à centrifugação a 2.000 g a 4°C durante 15 min a fim de separar o soro. Este foi então armazenado a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

3.1.3.3. Sangue humano:

As amostras de sangue foram coletadas de doadoras saudáveis não fumantes (20-30 anos) do próprio laboratório de pesquisa em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante e diluídas 1:100 (v/v) em solução de lise (tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 + Triton X-100 0,03%). Estas foram armazenadas a - 20°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

3.1.3.4. Enzima purificada:

A enzima purificada de órgão elétrico de enguia foi dissolvida em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contendo NaCl 144 mM, NaN₃ 0,05% e 1 mg/mL de albumina sérica bovina, de modo a obter-se 1 U /mL de solução.

3.1.4. Exposição à nicotina

3.1.4.1. Exposição aguda:

Ratas Wistar adolescentes (SPEAR, 2000) (\pm 30 dias de idade e pesando entre 70-100 g) receberam intraperitonealmente (i.p.) uma dose de 0, 0,5, 1 ou 5 mg/Kg de nicotina preparada em salina 150 mM. Dez min após a exposição os animais foram anestesiados e mortos por decapitação. Os cérebros foram removidos e o sangue coletado. Ambos os tecidos foram preparados como descrito anteriormente a fim de obter-se a fração S1 e soro, os quais foram armazenados a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

3.1.4.2. Exposição subcrônica:

Neste modelo, doses de 0, 0,5 ou 1 mg/Kg de nicotina preparada em salina, foram administradas subcutaneamente duas vezes ao dia (totalizando 0, 1 ou 2 mg/kg/dia, respectivamente) com intervalo de 12 horas entre as doses durante 15 ou 30 dias. Os animais foram observados por 20 min após cada injeção e possíveis alterações registradas. Os animais foram anestesiados e mortos por decapitação 12 horas após a última injeção em ambos os períodos de exposição. Como já descrito, os cérebros e soro dos animais foram preparados e armazenados a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos.

3.1.5. Ensaios enzimáticos:

As atividades específicas da AChE de cérebro, córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, soro e purificada foram determinadas pelo método espectrofotométrico de Ellman *et al.* (1961), modificado por Pereira *et al.* (2004). O meio de análise continha basicamente 50 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 1mM, 1 mL de tampão fosfato de potássio 24 mM (pH 7,2) e 50 µL de material enzimático. Após 2 min de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 25 µL de acetilcolina e monitorada por 2 min a 412 nm em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi expressa em µmol de acetilcolina hidrolisada/hora/mg de proteína para o tecido cerebral e estruturas e em U de atividade enzimática (µmol de substrato hidrolisado/min) para enzima purificada.

A atividade da AChE de sangue foi determinada segundo o método de Ellman *et al.* (1961), modificado por Worek *et al.* (1999). Em resumo, 1 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, 50 μ L de DTNB 0,30 mM, 10 μ L de etopropazina 0,02 mM (inibidor específico da BuChE) e 500 μ L de hemolisado 1:100 (v/v) foram pré-incubados durante 10 min a 37°C. A reação iniciava-se pela adição de 25 μ L de acetiltiocolina 0,45 mM e foi monitorada durante 2 min a 436 nm em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi expressa em μ mol de acetiltiocolina hidrolisada/h/mg de proteína.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas e os brancos apropriados foram conduzidos em todos os ensaios. A quantidade de proteína total foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão descritos em capítulos na forma de manuscritos.

No capítulo 1 estão apresentados os resultados referentes à sensibilidade da AChE de cérebro de ratas, de sangue humano e purificada de órgão elétrico de Enguia frente à nicotina, além de alguns parâmetros cinéticos da enzima, como K_m , V_{max} , EH e IC_{50} , das fontes acima citadas. Este manuscrito foi submetido à revista *Toxicology in vitro* e aguarda avaliação.

O capítulo 2 descreve o efeito da nicotina sobre a atividade da AChE de diferentes regiões do cérebro de ratas, como córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo, e algumas características cinéticas, tais como K_m , V_{max} e IC_{50} das regiões que apresentaram diferentes sensibilidades ao alcalóide.

No capítulo 3 são apresentados os resultados da exposição aguda e subcrônica à nicotina em ratas adolescentes sobre a atividade da AChE, ganho de peso corporal e peso cerebral dos animais.

4.1. CAPÍTULO 1- Manuscrito

SENSITIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE (E.C.3.1.1.7) FROM DIFFERENT SOURCES TO NICOTINE IN VITRO

Pereira, M.E. ^{*ab}, Figueiró, M. ^b, Sônego, F. ^a, Dörr, F.A., Jôse, A.S. ^a

^a Department of Chemistry, ^b Pos-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Campus Universitário – Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author :

Maria Ester Pereira

Phone/Fax: +55 55 32208799

E-mail: pereirame@yahoo.com.br

Running title: Acetylcholinesterase inhibition by nicotine

Abstract

Nicotine, besides causing addictive behavior, has been considered toxic to the central and peripheral nervous systems. Acetylcholinesterase is an important therapeutic target and a sensitive biomarker of exposure to pesticides and other chemicals. The purpose of this study was to investigate the sensitivity of acetylcholinesterase from brain of rats, whole human blood and purified enzyme of Electric Eel to nicotine *in vitro*. Kinetic parameters such as K_m , V_{max} , IC_{50} and hydrolysis efficiency (V_{max}/K_m) were determined using nicotine concentrations that ranged from 0 to 1 mM. The results demonstrated that K_m was increased by almost all nicotine concentrations in all sources investigated and V_{max} was reduced only at concentrations of 1 mM to brain and 0.5 mM to purified enzyme. Hydrolysis efficiency of acetylcholinesterase was altered by nicotine according to its effects on K_m . Enzyme from Eel ($IC_{50}=0.46$ mM) was slightly more sensitive to inhibitory effects of nicotine than enzyme from brain ($IC_{50}=0.77$ mM), and the latter was more sensitive than from blood ($IC_{50}=1.11$ mM). These results suggest that all sources of enzyme were sensitive to similar nicotine concentrations and presented the same features of inhibition, and point this enzyme as an important biomarker of exposure or contamination to nicotine of several biological materials.

Key words: acetylcholinesterase; nicotine; enzyme inhibition; kinetic parameters.

1. Introduction:

Serine esterases such as cholinesterases (ChE) are found in all vertebrate species, playing a crucial role in cholinergic neurotransmission and in other physiological events. Mammals have two main classes of ChE: acetylcholinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C.3.1.1.8) (Massoulié *et al.*, 1993; Lefkowitz *et al.*, 1996).

AChE is an important therapeutic target, predominantly found in the neuromuscular junction, erythrocyte membranes and in the central nervous system (CNS) (Massoulié *et al.* 1993). In the last tissue, AChE controls the transmission of nerve impulses across cholinergic synapses by hydrolyzing the acetylcholine, interrupting the action of this neurotransmitter in the cholinergic synapses (Taylor and Brown, 1993; Mileson, 1998). An increase of cholinergic transmission by preventing the acetylcholine hydrolysis is verified when inhibitors, such as organophosphates, bind to the catalytic site of the enzyme (Taylor and Brown, 1993; Taylor, 1996). The blood AChE enzyme is inhibited in parallel fashion to neuronal AChE, although this inhibition has unknown neurotoxic consequences. However, considering that blood AChE inhibition involves the same molecular target responsible for the neurotoxic effects, significant enzyme inhibition of this source may indicate blood AChE as potential biomarker for human exposure.

AChE exists in multiple molecular forms, which present similar catalytic properties, but different hydrodynamic parameters and ionic or

hydrophobic interactions (Massoulié *et al.*, 1993). The majority of the AChE in nervous tissue is of the globular type, mainly G4 and primarily membrane-bound form (Brimijoin, 1979; Massoulié *et al.*, 1993). In human blood, AChE is found in both erythrocytes and plasma. In erythrocytes, the G2 form is dominant existing both as soluble and as membrane-bound component. Serum contains only G4 form (Skau, 1985). Purified Electric Eel AChE is present mainly in the forms globular G2 and G4 and in the asymmetric A12 (Massoulié *et al.*, 1993). Lack of uniformity in the distribution of different molecular forms of AChE may be the reflex of functional heterogeneity in the central cholinergic system (Reiner and Fibiger, 1995).

Nicotine [3-(1-methyl-2-pyrrolidiny)-pyridine], a natural alkaloid present in tobacco leaves, is the active pharmacologic agent responsible for tobacco addictive behavior (Sohn *et al.*, 2003). It presents a very complex pharmacology as its cholinergic receptors perform many functions with different levels of activities and distribution in different part of the body (Anthony *et al.*, 1995; Benowitz, 2003). Its wide availability in several tobacco products and in certain pesticides makes nicotine a source of considerable toxicity in the central and peripheral nervous systems, causing a great variety of physiological alterations (Graeff, 1989; Anthony *et al.*, 1995; Yildiz, 2004).

Acute poisoning with nicotine is, fortunately, uncommon. However, long-term exposure to low levels, in contrast, is quite common and the

health effects of this exposure are of considerable epidemiological concern (Anthony *et al.*, 1995).

The toxic effects of nicotine and the AChE activity alterations by several toxicant agents suggested the aim of this paper. Then, we investigated the sensitivity of AChE to nicotine with the purpose of using this enzyme as a possible biomarker to this agent. We studied the enzyme activity from different sources, considering their origin and molecular forms.

2. Material and Methods

Chemicals

Acetylthiocholine (ATC), ethopropazine, 5,5-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), Tris (hydroxymethyl-d₃)amino-d₂-methane, Coomassie brilliant blue G and Electrical Eel purified AChE (Type WI-S) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); bovine serum albumin (fraction V), K₂HPO₄, KH₂PO₄ and Na₂HPO₄ were obtained from Reagen; nicotine was obtained from Aldrich (Germany); Triton X-100 was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All the others were of analytical grade.

Acetylcholinesterase assay

AChE activities were determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) as previously described (Rocha et al., 1993; Pereira et al., 2004). After pre-incubation for 2 min, the reaction was initiated by adding substrate (ATC) and the reaction velocity was measured by the increase of absorbance in 412 nm at 30°C for brain and purified enzyme. For whole blood AChE, after 10 min of pre-incubation, the reaction was initiated by adding ATC and the product formed was measured at 37°C by the increase of absorbance at 436 nm (Worek et al., 1999) during two minutes. All samples were run in duplicate or triplicate.

Sources enzyme and assay medium

Rats brain AChE

The adult female rats were killed under anesthesia by decapitation and the brain was quickly removed and placed on an inverted Petri dish on ice. The brain was dissected, weighed and homogenized in 10 volumes of a medium containing 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 160 mM sucrose. The total homogenate was centrifuged at 1,000 *g* in a Hitachi Refrigerated Centrifuges-Himac 21E (0-4°C) for 10 min to yield a low-speed supernatant (S1) and a pellet. The S1 fraction was used in AChE activity determination. The assay medium contained 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, 1 mM DTNB, 50 μ L of S1 (0.25 - 0.32 mg

protein) and ATC. Specific activity was expressed as μmol of substrate hydrolyzed per hour per mg protein.

Human whole blood AChE

Whole blood samples were collected in heparinized tubes and diluted 1:100 (v/v) with solution phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) buffer 0.1 M, pH 7.4, containing 0.03 % Triton X-100. AChE activity was determined in a medium containing 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 0.03 mM DTNB, 0.02 mM ethopropazine (in order to inhibit BuChE), 50 μL of hemolysate (1:100, v/v; 1.4 – 2.1 mg of protein) and ATC. The specific activity was expressed as μmol of substrate hydrolyzed per hour per mg protein.

Electric Eel purified AChE

The purified enzyme was dissolved into 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 144 mM NaCl, 0.05% NaN_3 and 1 mg/mL of bovine serum albumin, in order to obtain 1 unit of enzyme activity per mL of solution (1 U/mL). The enzymatic assay medium was identical to the medium used for brain enzyme. The enzyme activity was defined as: one unit hydrolyzes 1 μmol of ATC per min at pH 7.2. The specific activity is presented as U.

Kinetic parameters

K_m and V_{max}

K_m and V_{max} parameters of AChE from rat brain, human whole blood and purified enzyme were determined using the kinetic method of Michaelis-Menten, plotting initial velocity (V) versus substrate concentrations [S] (Down and Riggs, 1965).

The effect of alkaloid on these parameters was analyzed using nicotine concentrations of 0, 0.1, 0.25 and 1 mM for brain; 0, 0.1, 0.5 and 1 mM for whole blood; 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mM for purified enzyme. ATC was used in concentrations of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mM for brain; 0.014, 0.028, 0.056, 0.225 and 0.450 mM for whole blood; and 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.5 mM for purified enzyme.

IC₅₀ and hydrolysis efficiency

IC₅₀, inhibitor concentration necessary to reduce the initial velocity to half, was determined using Dixon plot (Dixon and Webb, 1964). The hydrolysis efficiency (HE) was calculated by the ratio between V_{max} and K_m (HE = V_{max}/K_m). These data represent the ability of enzyme to convert the substrate in product considering its affinity by the substrate (Dixon & Webb, 1964).

Protein determination

Protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by *post hoc* Duncan's multiple range test or by Student *t* test when appropriate. Differences between the groups were considered significant when, at least, $p < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Sciences (SPSS) software.

3. Results

Effects of nicotine on K_m and V_{max} of AChE:

Michaelis-Menten plots of initial velocity versus substrate concentrations in the presence of various nicotine concentrations for brain, blood and purified AChE activities are shown in Figures 1 A-C. Apparent K_m and V_{max} calculated from these plots are presented in Table 1. Comparisons between the two groups (0 mM and 0.1, 0.25, 0.5 or 1.0 mM) were done by the Student *t* test. The results demonstrated that nicotine significantly induces an increase of K_m in almost all concentrations tested. For brain enzyme the *t* values were: 0.25 mM, $t(8) = -5.36$, $p < 0.001$; 1 mM, $t(8) = -4.77$, $p < 0.001$. For whole blood: 0.1 mM, $t(4) = -5.37$, $p < 0.006$; 0.5 mM, $t(4) = -4.46$, $p < 0.01$; 1 mM, $t(4) = -2.67$, $p = 0.05$; and for purified enzyme: 0.1 mM, $t(4) = -4.45$, $p < 0.01$; 0.25 mM, $t(4) = -3.35$, $p < 0.03$; 0.5

mM, $t(4) = -2.63$, $p=0.05$. V_{\max} parameter was slightly decreased by nicotine, however, a significant fall was observed only by 1 mM of nicotine for brain enzyme [$t(8) = 2.97$, $p<0.02$] and 0.5 mM for purified AChE [$t(4) = 3.93$, $p<0.02$), reducing the V_{\max} in 55% and 64 % from 0 mM nicotine, respectively.

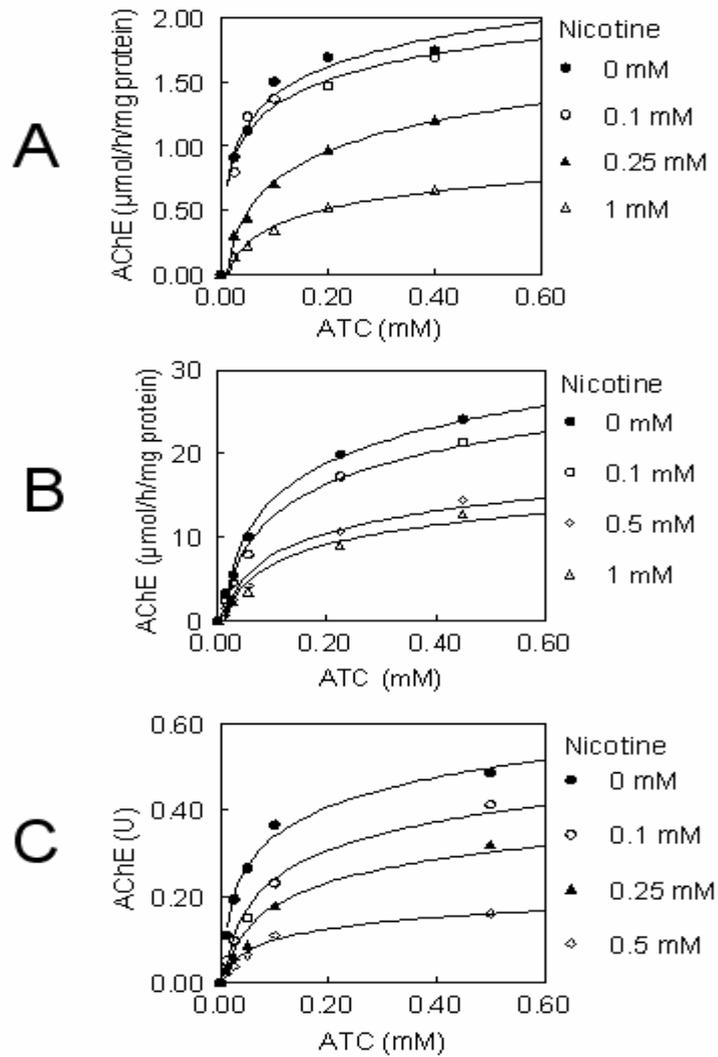


Fig. 1. Effect of nicotine on the AChE activity from rat brain (A), blood (B) and purified of Electric Eel (C). Michaelis-Menten plots show the enzymatic activities in the presence of 0 – 1 mM of nicotine. Each value is the mean of three or four enzymatic preparations.

Table 1. Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) of AChE in the presence of nicotine.

	Nicotine concentration (mM)				
	0	0.10	0.25	0.50	1.00
BRAIN (n=4)					
K_m	0.031±0.011	0.021±0.035	0.110±0.055*	-	0.163±0.030*
V_{max}	2.06±0.20	1.87±0.31	1.70±0.29	-	1.13±0.23*
BLOOD (n=3)					
K_m	0.116±0.005	0.144±0.002*	-	0.253±0.030*	0.280±0.070*
V_{max}	30.50±5.63	28.20±6.14	-	22.00±4.28	21.14±5.33
PURIFIED ENZYME (n=3)					
K_m	0.047±0.012	0.113±0.009*	0.170±0.037*	0.239±0.072*	-
V_{max}	0.53±0.05	0.50±0.09	0.42±0.03	0.34±0.006*	-

Apparent K_m and V_{max} were determined by the Michaelis-Menten method (V versus $[S]$) of the results shown in Fig. 1 (A-C). The results are presented as mean \pm S.E. n = number of enzymatic assays. The apparent K_m is expressed as mM of ATC and V_{max} as μ mol of substrate (ATC) hydrolyzed per hour per mg of protein, for rat brain and human whole blood, and as U enzymatic activity for purified enzyme. Significantly different from the 0 mM (Student t test): * at least $p < 0.05$.

Hydrolysis efficiency and IC₅₀

HE from three sources, the effect of nicotine on this relation and the nicotine IC₅₀ are shown in Table 2. The Student *t* test revealed that the HE of substrate was reduced by nicotine [brain: 0.25 mM, $t(8) = 3.54$, $p < 0.008$; 1 mM, $t(8) = 3.94$, $p < 0.004$; blood: 0.5 mM, $t(4) = 3.41$, $p < 0.03$, 1 mM, $t(4) = 4.93$, $p < 0.008$; purified: 0.1 mM, $t(4) = 2.95$, $p < 0.04$; 0.25 mM, $t(4) = 3.44$, $p < 0.03$; 0.5 mM, $t(4) = 3.93$, $p < 0.02$]. However, this effect was a consequence of an increase of K_m , since V_{max} did not suffer significant inhibitions by the lowest nicotine concentration.

The nicotine IC₅₀ for different sources is shown in Table 2. The statistical analysis (one-way ANOVA) demonstrated significant differences among the sources [$F(2,7) = 10.06$; $p < 0.01$]. *Pos-hoc* statistical test revealed that it is necessary lower nicotine concentration to inhibit 50 % (IC₅₀) of purified AChE activity than to blood and brain enzymes. This last source also presented lower nicotine IC₅₀ than blood enzyme, although this difference was not significant.

Table 2. Hydrolysis efficiency and IC₅₀ values for AChE from rat brain, human blood and purified eel.

Nicotine (mM)	Brain	Blood	Purified
	Vmax / Km		
0	89.63±15.57	259.14±36.11	12.53±2.71
0.10	96.77±31.70	196.50±45.35	4.42±0.65 ^a
0.25	15.44±2.57 ^a	-	2.82±0.77 ^a
0.50	-	94.57±31.91 ^a	1.69±0.50 ^a
1.00	7.45±1.50 ^a	77.22±7.58 ^a	-
IC ₅₀ (mM)	0.77±0.10 ^b	1.22±0.17 ^b	0.46±0.05

Hydrolysis efficiency was calculated as V_{max}/K_m , according to individual values presented as mean \pm S.E. presented in Table 1. Significantly different from the 0 mM (Student *t* test): ^a at least $p < 0.05$. IC₅₀ values were calculated by Dixon method. Significantly different from blood and brain AChE sources (Duncan's multiple range test): ^b at least $p < 0.01$.

4. Discussion

The aims of this study were to investigate the sensitivity of AChE activity from rat brain, human blood and purified of Electric Eel AChE to nicotine *in vitro*, and to determine the kinetic parameters of the enzyme.

Our results demonstrated that at low concentrations, nicotine seems to compete with substrate for binding at the catalytic site, since the K_m presented increased and inhibitor did not modify the V_{max} . At high nicotine concentrations, again the competitive factor is present in this inhibition, since the decrease of V_{max} occurs concomitantly to the increase of K_m . These results still demonstrate that K_m obtained (in the absence of inhibitor) for the three sources of enzyme presents the same magnitude order. V_{max} comparisons between the purified AChE with the other sources studied are not possible due to the different unit used to express the specific activity. It was also verified that the blood AChE presented a V_{max} approximately 15 times higher than that presented by brain AChE, but a K_m only 4 times larger, which characterize a high catalytic efficiency of the blood AChE source.

HE obtained by all AChE sources was reduced by nicotine. However, as the V_{max} parameter was not modified by lower concentrations of this compound, this effect on HE was due to an increase of K_m , suggesting a probable reduction in the number of enzyme molecules available to hydrolyze the substrate.

Regarding the sensitivity of the AChE activity to nicotine, these results show a similarity of effects, since the nicotine IC_{50} values obtained for brain, blood and purified were of 0.77, 1.22 and 0.46 mM, respectively. However, it is possible to observe that the IC_{50} to purified enzyme is lower than to the brain AChE, and the latter lower than to blood enzyme. The similarity of nicotine effects on K_m , V_{max} and IC_{50} for brain, blood and purified AChE may be due to the predominance of the G4 molecular globular form in these sources. I.e., the rat nervous tissue has mainly G4 AChE, whereas the Electric Eel purified enzyme contains not only G2 and G4 globular forms, but also A12. As the human whole blood has a mixture of plasma and erythrocytes AChE (the BuChE activity was inhibited by ethopropazine), the total enzyme activity obtained is a consequence of the presence of G4 and G2 forms, respectively (Brimijoin, 1979; Skau, 1986; Massoulié *et al.*, 1993). Few studies have been reported about the AChE activity nicotine effects. Our results according with those obtained by Nwosu *et al.* (1992) in AChE from electric organ, but differ from the results obtained by Dowla *et al.* (1996), which reported that AChE from human plasma was not inhibited by nicotine *in vitro*.

Nicotine may be implicated in several biological processes in most of which displaying different effects. Therefore, making an elucidation of its exact role seems to be very difficult (Yildiz, 2004). In general, the biochemical basis of neurotoxicity induced by nicotine is rather complex and not completely understood. Some investigators suggest that the

chronic administration of nicotine in rats have induced a decrease in the brain AChE activity (Chang *et al.*, 1972), which agrees with the results obtained for the cerebral AChE in this paper.

In conclusion, our results reveal that nicotine inhibits AChE activities in a competitive manner, or at least, the inhibition type includes a competitive factor. Furthermore, the similar inhibition on AChE activity from the sources studied suggests that this enzyme may be important as a biomarker of exposure or contamination to nicotine from several biological materials.

5. Acknowledgements

M.F. is recipient of CAPES and F.S. is recipient of FAPERGS (03/50951.5) fellowships.

6. References

- Anthony, D.C., Montine, T.J. and Graham, D.G. (1995) Toxic responses of the nervous system. In *Casarett & Doull's toxicology the basic science of poisons*. Edited by C. D. Klaassen. pp. 463-486. McGraw-Hill Companies, Kansas, USA.
- Benowitz, N.L. (2003) Basic cardiovascular research and its implications for the medicinal use of nicotine. *Journal of the American College of Cardiology* **41**, 497-498.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brimijoin, S. (1979) Axonal transport and subcellular distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rabbit sciatic nerve. *Molecular Pharmacology* **15**, 641-648.
- Chang, P.-L., Bhagat, B. and Taylor, J.J. (1973) Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. *Brain Research* **54**, 75-84.
- Dixon, M. and Webb, E.C. (1964) *Enzymes*. p. 950. Longmans, London, England.

- Dowla, H.A., Panemangalore, M. and Byers, M.E. (1996) Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma *in vitro* by agricultural chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 107-114.
- Down, J.E. and Riggs, D.S. (1965) A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformation. *Journal of Biological Chemistry* **240**, 863-869.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. and Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88-95.
- Graeff, F.G. (1989) Abuso e dependência de drogas. In *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. Edited by F.G. Graeff. pp. 101-135. EPU, São Paulo.
- Lefkowitz, R.J., Hoffman, B.B. and Taylor, P. (1996) Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edited by J. G. Hardman, A. G. Gilman & L. E. Limbird. pp. 105-140. McGraw-Hill Companies, New York, USA.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, S. and Vallette, F.-M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology* **41**, 31-91.

Mileson, B.E., Chambers, J.E., Chen, W.L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A. T., Gaylor, D.W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karezmar, A.G., Padilla, S., Pope, C.N., Richardson, R.J., Saunders, D.R., Sheets, L.P., Sultatos, L.G. and Wallace, K.B. (1998) Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicological Science* **41**, 8-20.

Nwosu, T.N., Palleschi, G. and Mascini, M. (1992) Comparative studies of immobilized enzyme electrodes based on the inhibitory effect of nicotine on choline oxidase and acetylcholinesterase. *Analytical Letters* **25**, 821-835.

Pereira, M.E., Adams, A.I.H. and Silva, N.S. (2004) 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters* **146**, 269-274.

Reiner, P.B. and Fibiger, H.C. (1995) Functional heterogeneity of central cholinergic system. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Edited by F.E. Bloom & D.J. Kupfer. pp. 147-154. Raven Press Ltd., New York.

Rocha, J.B.T., Emanuelli, T. and Pereira, M.E. (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* **53**, 431-437.

- Skau, K.A. (1985) Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* **80C**, 207-210.
- Skau, K.A. (1986) Mammalian acetylcholinesterase molecular forms. *Comparative Biochemistry and Physiology* **83C**, 225-227.
- Sohn, M., Hartley, C., Froelicher, E.S. and Benowitz, N.L. (2003) Tobacco use and dependence. *Seminars in Oncology Nursing* **19**, 250-260.
- Taylor, P. (1996) Anticholinesterase agents. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edited by J.G. Hardman, A.G. Gilman & L.E. Limbird. pp. 161-176. McGraw-Hill Companies, New York, USA.
- Taylor, P. and Brown, J.H. (1993) Acetylcholine. In *Basic Neurochemistry*. Edited by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers & P.B. Molinoff. pp. 231-260. Raven Press, New York, USA.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C. and Eyer, P. (1999) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta* **288**, 73-90.
- Yildiz, D. (2004) Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* **43**, 619-632.

4.2. CAPÍTULO 2- Manuscrito

NICOTINE INDUCES INHIBITORY EFFECTS ON AChE ACTIVITY OF RAT BRAIN REGIONS

Micheli Figueiró¹, Fabiane Sônego² and Maria E. Pereira^{1,2*}.

¹Pos-Graduation Program in Toxicological Biochemistry, ² Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

*Author for correspondence:

Maria Ester Pereira

Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, University Campus of Camobi, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brazil.

Phone/Fax: + 55 55 32208799

E-mail: pereirame@yahoo.com.br

Running title: Nicotine inhibits the AChE activity.

Abstract:

Nicotine is the active pharmacological agent responsible for tobacco addictive behavior. It can cause considerable toxicity on central and peripheral nervous system. The purpose of this study was to examine the effect of nicotine on the acetylcholinesterase activity of specific rat brain regions enriched in cholinergic innervations (striatum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum). The acetylcholinesterase activity was assayed colorimetrically by the method of Ellman (1961). Kinetic parameters as K_m , V_{max} and IC_{50} were determined. The results report an inhibitory effect of nicotine on acetylcholinesterase activity of all the brain regions analyzed. The maximal of inhibition induced by 1 mM of nicotine on the acetylcholinesterase activity was 45.4% for striatum, 44.3% for cortex, 43.5% for hippocampus, 41.9% for cerebellum, and 35.2% for hypothalamus. The IC_{50} values of cerebellum, cortex, striatum and hippocampus enzymes were similar (1.21 – 1.43 mM nicotine), and the IC_{50} value for hypothalamus acetylcholinesterase (1.89 mM) was significantly greater than the other structures. The kinetics parameters, K_m and V_{max} , were modified by nicotine, which induced an increase of K_m and a decrease of V_{max} on enzyme of all structures analyzed. Thus, the results show that although there are differences among the enzymatic activities according to the structure, the features of the inhibition induced by nicotine were similar, probably as a consequence of the presence of the same molecular globular form in these brain regions.

Key words: cholinesterase, nicotine, enzyme inhibition, kinetic parameters, acetylcholinesterase, cerebrum, striatum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, cerebellum.

1. Introduction:

Cholinesterases (ChE) are serine esterases found in all vertebrate species. They play a crucial role in cholinergic synapses and in other physiological events. Mammals have two main classes of ChE: acetylcholinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C.3.1.1.8) (Massoulié et al., 1993; Lefkowitz et al., 1996). AChE is predominantly found in the neuromuscular junction, erythrocyte membranes and in central nervous system (CNS) in different molecular forms, which present similar catalytic properties, but different hydrodynamic parameters and different ionic or hydrophobic interactions (Massoulié et al., 1993).

This enzyme is among the fastest of enzymes. This feature is an evolutionary consequence of one of its key activities, that is, the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) to terminate signaling in cholinergic synapses. The great speed of the enzyme is essential for the rapid modulation of the synaptic activity (Shen et al., 2002).

The AChE distribution varies according to brain regions (Das et al., 2001), and appears to be correlated to innervations and development of the nervous system (Taylor and Brown, 1994). Furthermore, Das et al. (2001) showed that AChE presents a significant quantitative variation of activity in several areas of the brain supplied by cholinergic projection neurons in adult and old rats, including striatum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum. These areas differ in

functional aspects, and their main functions seem to be related with the alert state at any sensorial stimulus, learning and memory, and motor control (Rang et al., 2004).

Recently, we demonstrated that nicotine, the active pharmacologic agent responsible for the tobacco addictive behavior (Sohn et al., 2003), inhibit AChE activities of rat brain, whole human blood and purified enzyme of Electric Eel (Pereira et al., 2005 *submitted to publication*). Considering that the sensitivity of AChE to nicotine was relatively similar among different sources, this enzyme may be an important biomarker of exposition to nicotine. Furthermore, when considered the different AChE activity according to brain structure, it is possible to suppose that nicotine could alter these activities with different magnitudes. Thus, in this study, we examined the effect of nicotine on AChE activity of rat brain regions (striatum, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum) and determined the kinetic parameters of AChE of the regions that showed different sensibilities to alkaloid.

2. Material and Methods:

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine (ATC), 5,5-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), Tris (hydroxymethyl-d₃) amino-d₂-methane and coomassie brilliant blue G were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); bovine serum albumin (fraction V), K₂HPO₄ and KH₂PO₄ were obtained from Reagen;

and (S) - nicotine was obtained from Aldrich (Germany). All the others were of analytical grade.

2.2. Tissue preparation

The female Wistar adult rats (2-3 months old) were anesthetized, decapitated, the cerebrum was quickly removed, placed on ice and cerebral structures were dissected. Hypothalamus, cerebellum and cortex were homogenized in 10 volumes of a medium containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.2, and 160 mM sucrose. Hippocampus and striatum were homogenized in 20 volumes of the same medium. The homogenates were centrifuged at 1,000 *g* in a Hitachi Refrigerated Centrifuges-Himac 21E (0 - 4°C) for 15 min to yield a low-speed supernatant (S1) and a pellet. The S1 fraction was used in AChE activity determination.

2.3. Acetylcholinesterase assay

AChE activities were determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. (1961) as previously described (Rocha *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2004). After pre-incubation for 2 min, the reaction was initiated by adding ATC, and the reaction velocity was measured by the increase of absorbance at 412 nm and 30°C. The assay medium contained 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, 1 mM DTNB, 50 µL of S1 (1-2.5 mg of protein/mL), nicotine 0 - 1 mM and ATC 0.8 mM. The nicotine concentration necessary to inhibit 50% of original enzyme activity (IC₅₀) was calculated according to Dixon method (Dixon and Webb, 1964).

K_m and V_{max} parameters of AChE from striatum, cortex and hypothalamus were determined using the kinetic method of Michaelis-Menten, plotting initial velocity (V) versus substrate concentrations [S] (Down and Riggs, 1965). The effects of alkaloid on these parameters were analyzed using nicotine concentrations of 0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mM for striatum, and 0, 0.25 and 1 mM for cortex and hypothalamus. ATC concentrations were 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 mM for striatum, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mM for cortex, and 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mM for hypothalamus. The specific activity was expressed as μmol of substrate hydrolyzed per hour per mg protein. All samples were run in duplicate or triplicate.

2.4. Protein determination

Protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed by two-way (considering nicotine concentration as dependent measurement X brain structure) or by one-way ANOVA followed by *post hoc* Duncan's multiple range test when necessary or by paired Student t-test. Differences between groups were considered significant when, at least, $P < 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Sciences (SPSS) software.

3. Results:

Effect of nicotine on AChE activity:

The curves of AChE inhibition of brain regions by nicotine are shown in Figures 1 A-E.

The two-way ANOVA (nicotine concentration x brain structure) revealed significant effect of nicotine [$F(4,40) = 135.75$; $p < 0.001$], brain structure [$F(4,10) = 41.35$; $p < 0.001$] and nicotine versus brain structure interaction [$F(16,40) = 32.76$; $p < 0.001$]. The interaction was significant because the structures present a short difference of sensitivity to inhibitory effects of nicotine. The inhibition percentage curves to improve the understanding of the sensibility of AChE of brain regions to nicotine are showed in Figure 1 F.

The one-way ANOVA comparing the IC_{50} values for brain structures showed significant differences among them [$F(4, 10) = 4.086$, $P < 0.03$]. The *pos-hoc* Duncan's multiple range test revealed that the IC_{50} for hypothalamic AChE was greater than those obtained for the other structures (table 1).

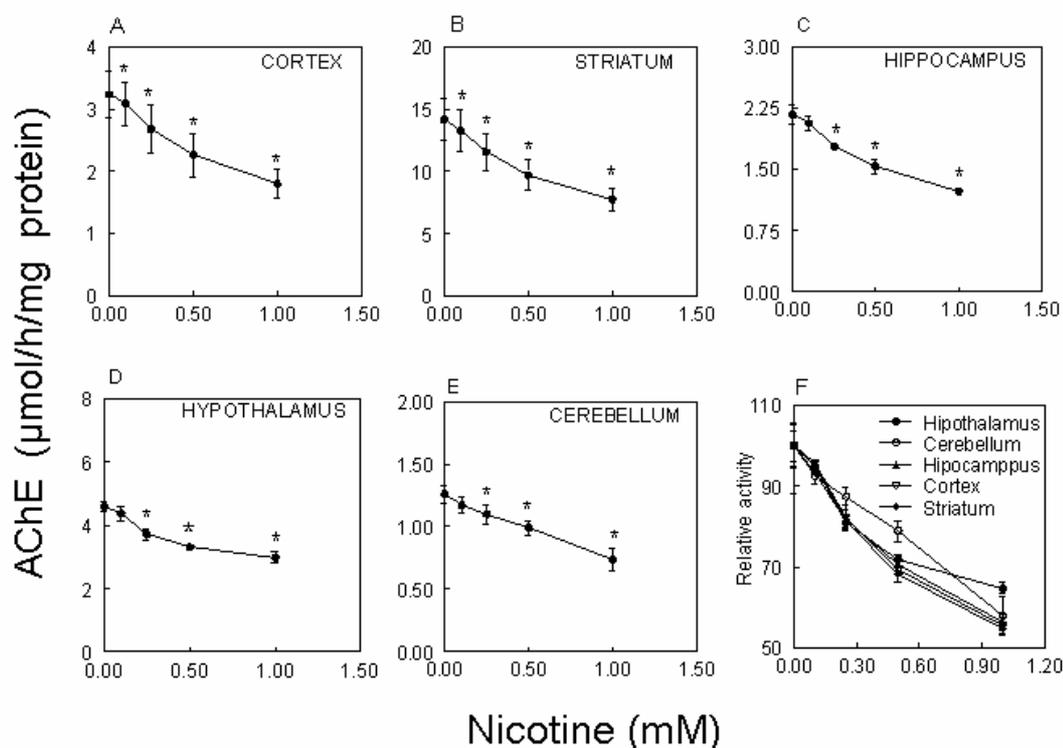


Figure 1. Effect of nicotine on the AChE activities from cortex (A), striatum (B), hippocampus (C), hypothalamus (D), and cerebellum (E) of rat brain. The curves show the enzymatic activities in the presence of 0 – 1 mM of nicotine and 0.8 mM of ATC. Each value represents the mean \pm S.E. of specific activity from three independent enzymatic preparations. Figure 1F shows the percentage curves of nicotine inhibition. The comparisons among structures are described in the text. * Differ from 0 mM for the same structure at least $P < 0.05$ (Student *t* test).

Table 1: IC₅₀ values for AChE from brain structures

	Cortex	Striatum	Hippocampus	Cerebellum	Hypothalamus
IC ₅₀ (mM)	1.22±0.03	1.21±0.1	1.30±0.09	1.43±0.26	1.89±0.1*

The IC₅₀ values were calculated by Dixon method. The results are presented as S.E.M. Significant difference of the others brain structures (Duncan's multiple range test): * at least $P < 0.05$.

Michaelis-Menten plots of initial velocity versus substrate concentrations in the presence of various nicotine concentrations for striatum, cortex and hypothalamus AChE activity are shown in Figures 2 A-C. Apparent K_m and V_{max} calculated from these plots are presented in Table 2. The one-way ANOVA revealed that the nicotine significantly alters the values of K_m [striatum: $F(4,14) = 13.72$, $P=0.001$; cortex: $F(2,8) = 19.80$, $P<0.002$; hypothalamus: $F(2,8) = 527.72$, $P<0.001$] and of V_{max} [striatum: $F(4,14) = 7.685$, $P<0.004$; cortex: $F(2,8) = 40.42$, $P<0.001$; hypothalamus: $F(2,8) = 9.77$, $P<0.013$]. The inhibitory effects of nicotine are characterized by significant increase of K_m and decrease of V_{max} (Duncan's multiple range test) according to the increase of the inhibitor concentration.

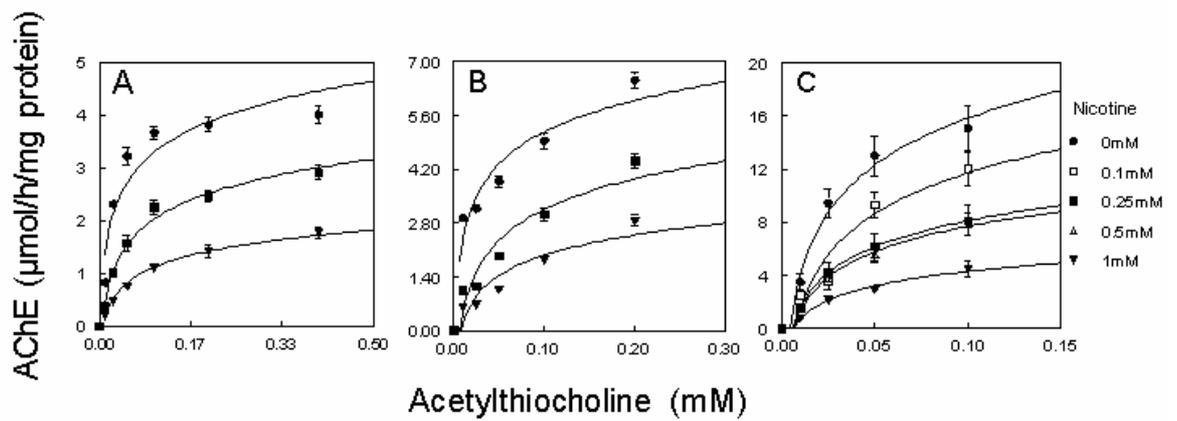


Figure 2. Michaelis-Menten plots of AChE activity from cortex (A) hypothalamus (B) and striatum (C) in the presence of nicotine (0 – 1 mM). Each value represents the mean \pm S.E. of three independent enzymatic preparations.

Table 2: Kinetic parameters (apparent K_m and V_{max}) of AChE in the presence of nicotine

		Nicotine concentration (mM)				
		0	0.10	0.25	0.50	1.00
STRIATUM (n=3)						
K_m	0.036±0.005	0.047±0.003	0.055±0.006*	0.064±0.003*	0.081±0.004*	
V_{max}	21.04±2.38	17.86±2.11	12.62±1.55*	12.95±1.60*	8.05±1.17*	
CORTEX (n=3)						
K_m	0.024±0.002	-	0.057±0.003*	-	0.101±0.014*	
V_{max}	4.40±0.33	-	3.29±0.24*	-	2.20±0.31*	
HYPOTHALAMUS (n=3)						
K_m	0.022±0.001	-	0.122±0.002*	-	0.190±0.006*	
V_{max}	6.51±0.20	-	6.97±0.29	-	5.50±0.21*	

Apparent K_m and V_{max} were determined by the Michaelis-Menten method (V versus $[S]$) of the results shown in Fig. 2A-C. Results are presented as mean \pm S.E. n = number of enzymatic assays. The apparent K_m is expressed as mM of ATC and V_{max} as μ mol of substrate (ATC) hydrolyzed per hour per mg of protein. Significantly different from its respective control (0 mM of nicotine) by Duncan's multiple range test: * at least $P < 0.05$.

4. Discussion:

The aims of this study were to examine the effect of nicotine on AChE activity of rat brain regions that are rich in cholinergic innervations and determined the kinetic parameters of AChE of regions that showed different sensibilities to alkaloid.

We verified that the striatum presented specific AChE activity approximately 5 times higher than that present by cortex and 3 times higher than that presented by hypothalamus, suggesting differences in the regional distributions of this enzyme and/or in their efficiency of hydrolysis. This result is in accordance with other authors, who found that the striatal AChE has higher capacity to convert substrate in product (Das et al., 2001; Appleyard et al., 1990).

The nicotine inhibitory effects were similar on AChE activity from all brain regions studied, although the striatum and cortex seem to be more sensitive, whereas the hypothalamus seems to be less sensitive to alkaloid. It is acceptable that brain regions could present different sensibility at different toxics agents and that AChE activity could differently answer to them. These regional differences may indicate the importance and vulnerability of the cholinergic via in different brain regions (Kaizer, et al., 2004).

Michaelis-Menten plots for striatum, cortex and hypothalamus demonstrated that nicotine induce an increase of K_m and a decrease of V_{max} . These kinetics alterations characterize a mixed inhibition of AChE by

nicotine, i.e., the inhibitor would act by diminishing the affinity of enzyme to substrate and by decreasing the velocity of the liberation of the product, characterizing a mixture of competitive and non-competitive effects (Segel, 1975). Furthermore, the alterations in K_m and V_{max} of the striatum and cortex AChE just occurred in an intermediate concentration of nicotine (0.25 mM), whereas to hypothalamus, the V_{max} alterations were possible using only 1 mM of nicotine.

In all cholinergic regions studied in this work, the principal function of AChE is to terminate the cholinergic transmission by acetylcholine hydrolysis (Taylor and Brown, 1993; Mileson, 1998; Appleyard et al., 1990). Hence, alterations in the levels of AChE activity by nicotine could reflect or result in alteration of cholinergic transmission. As consequence, it would be possible to verify falls in the motor control, in the process of learning and memorizing and other cognitive functions, since they are attributed to the regions of the brain supplied by cholinergic projection neurons (Rang et al., 2004; Das et al., 2001). Actually, nicotine has been found to induce numerous neurochemical changes in several areas of the brain, primarily in cognitive regions (Singer et al., 2004). Besides, systemic nicotine administration seems to increase ACh levels in some structural regions such as cortex, hippocampus, and striatum (Toide et al., 1989).

The biochemical basis of neurotoxicity induced by nicotine is rather complex and not completely understood. It may be implicated in several

biological processes and, in most of which, display different effects (Yildiz, 2004).

In vitro, it has been demonstrated that nicotine inhibits both δ -aminolevulinic acid dehydratase and superoxide dismutase (SOD) activities. SOD demonstrated to be most sensitive to the alkaloid, once the concentration required to inhibit 86 % of δ -aminolevulinic acid dehydratase is much higher (163 mM) than that necessary to inhibit the SOD (1.6 mM) (Dowla et al., 1996). Previously, we verified that nicotine concentrations that inhibit the AChE from different sources, *in vitro*, are in accordance to that necessary to inhibit the SOD. We also demonstrated that the inhibitions induced by alkaloid on AChE of rat brain, whole human blood and purified enzyme of Electric Eel were similar. The similarity of nicotine effects on these sources may be due to the predominance of the same molecular globular forms of AChE (Pereira et al., 2005 *submitted to publication*). This molecular feature could also explain the magnitude effects of nicotine on striatum, cortex and hypothalamus AChE, which was like the effects on the brain AChE activity, mainly when considered the same magnitude order to inhibit this enzyme.

5. References:

- Appleyard, M.E., Taylor, S.C., Little, H.J., (1990). Acetylcholinesterase activity in regions of mouse brain following acute and chronic treatment with a benzodiazepine inverse agonist. *Br. J. Pharmacol.* 101, 599-604.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Das, A., Dikshit, M., Nath C., (2001). Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sciences*, 68, 1545-1555.
- Dixon, M., Webb, E.C., (1964). Enzyme Inhibitors. In *Enzymes*, Longmans, London, England, vol. 2 pp. 315-329.
- Dowla, H.A., Panemangalore, M., Byers, M.E., (1996). Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma *in vitro* by agricultural chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31, 107-114.
- Down, J.E., Riggs, D.S., (1965). A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformation. *J. Biol. Chem.* 240, 863-869.

- Ellman, G. L., Courtney, K.D., Jr., A.V., Featherstone, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Kaizer, R.R., da Silva, A.C., Morsch, V.M., Corrêa, M.C., Schetinger, M.R.C., (2004). Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure. *Neurochem Res.* 29, 2251-2255.
- Lassiter, T.L., Jr., B.S., Padilla, S., (1998). Ontogenetic differences in the regional and cellular acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the rat brain. *Devel. Brain Res.* 105, 109-123.
- Lefkowitz, R.J., Hoffman, B.B., Taylor, P., (1996). Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, USA, Vol. 9, pp. 105-140.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.-M., (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31-91.
- Mileson, B.E., Chambers, J.E., Chen, W.L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A.T., Gaylor, D.W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karezmar, A.G., Padilla, S., Pope, C.N., Richardson, R.J., Saunders, D.R., Sheets, L.P., Sultatos, L.G., Wallace, K.B., (1998). Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci.* 41, 8-20.

- Pereira, M.E., Adams, A.I.H., Silva, N.S., (2004). 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.* 146, 269-274.
- Pereira, M.E., Figueiró, M., Sônego, F., Dörr, F.A., Jôse, A.S., (2005). Nicotine inhibits acetylcholinesterase activity from different sources. *Toxicol. invitro* [submitted for publication].
- Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., Pereira, M.E., (1993). Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* , 53, 431-437.
- Singer, S., Rossi, S., Verzosa, S., Hashim, A., Lonow, R., Cooper, T., Sershen, H., Lajtha, A., (2004). Nicotine-induced changes in neurotransmitter levels in brain areas associated with cognitive function. *Neurochem. Res.* 29, 1779-1792.
- Shen, T., Tai, K., Henchman, R.H., Mccammon, J.A., (2002). Molecular dynamics of acetylcholinesterase. *Acc. Chem. Res.* 35, 332-340.
- Sohn, M., Hartley, C., Froelicher, E.S., Benowitz, N.L., (2003). Tobacco use and dependence. *Sem. in Oncol. Nurs.*, 19, 250-260.
- Taylor, P. and Brown, J.H., (1994). Acetylcholine. In: *Basic Neurochemistry*, Raven Press, New York, USA, Vol. 5, pp. 231-260.

Toide, K. and Arima, T., (1989). Effects of cholinergic drugs on extracellular levels of acetylcholine and choline in rat cortex, hippocampus and striatum studied by brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 173, 133-141.

Yildiz, D., (2004). Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon*, 43, 619-632.

4.3. CAPÍTULO 3 - Manuscrito

ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL E DA COLINESTERASE SÉRICA DE RATAS ADOLESCENTES SUBMETIDAS À ADMINISTRAÇÃO AGUDA OU SUBCRÔNICA DE NICOTINA

Micheli Figueiró¹, Fabiane Sônego² e Maria E. Pereira^{1,2*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica - Centro de Ciências Naturais e Exatas, ²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Camobi
97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

* Autor correspondente:

Fone/fax: (55) 32208799

E-mail: pereirame@yahoo.com.br

Agência de fomento: CAPES e FAPERGS

RESUMO

Resultados prévios deste grupo de pesquisa têm demonstrado que a nicotina inibe, *in vitro*, a atividade da acetilcolinesterase de cérebro de ratas, de sangue humano e purificada de órgão Elétrico de Enguia. O conhecimento dos efeitos da nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase fornecerá dados importantes para uma possível compreensão de sua ação sobre o sistema colinérgico. Assim, este trabalho investigou o efeito da administração aguda e subcrônica do alcalóide sobre a atividade da acetilcolinesterase de cérebro e da colinesterase de soro de ratas Wistar adolescentes (\pm 30 dias de idade), além de avaliar os efeitos sobre o peso cerebral e o ganho de peso corporal dos animais. Na exposição aguda as ratas receberam uma dose intraperitoneal de 0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg de nicotina preparada em salina 150 mM. Dez minutos após a exposição, os animais foram anestesiados e mortos por decapitação. O cérebro foi removido, pesado, homogeneizado e centrifugado. O soro foi obtido após a centrifugação do sangue total. Na exposição subcrônica, doses de 0, 0,5 ou 1,0 mg/kg de nicotina foram administradas subcutaneamente duas vezes ao dia (totalizando 0, 1 ou 2 mg/kg/dia, respectivamente), com intervalo de 12 horas entre as doses, por um período de 15 ou 30 dias. Os animais foram pesados a cada dois dias e mortos 12 horas após a última injeção em ambos os períodos de exposição. O material biológico foi coletado e preparado como descrito anteriormente. Para a determinação das atividades enzimáticas foi

utilizado o método espectrofotométrico de Ellman. Os resultados demonstram que as atividades da acetilcolinesterase cerebral e da colinesterase sérica não foram alteradas pela exposição aguda ou subcrônica a nicotina. Além disso, não houve alteração no ganho de peso corporal e no peso cerebral dos animais expostos subcronicamente por 15 ou 30 dias. A ausência de efeito da nicotina *ex vivo*, pode estar relacionada pelo menos a duas hipóteses: níveis baixos de nicotina atingidos *in vivo*; ou uma possível inibição induzida por baixas concentrações do alcalóide (*in vivo*) estar sendo revertida pelo excesso de substrato ensaiado *ex vivo*.

Palavras-chaves: nicotina; exposição aguda e subcrônica; acetilcolinesterase cerebral; colinesterase sérica; ganho de peso corporal; peso cerebral.

ABSTRACT

Cerebral acetylcholinesterase and serum cholinesterase of female rats submitted at the acute or subchronic administration of nicotine

Previously we demonstrated that nicotine inhibits, *in vitro*, the acetylcholinesterase activity from brain of rats, human blood and purified of Electric Eel organ. The knowledge about the nicotine effects on the acetylcholinesterase will provide important information for the understanding of its action on the cholinergic system. Therefore, this work investigated the effect of acute and subchronic nicotine exposures on the brain acetylcholinesterase and serum cholinesterase activities from female Wistar rats (± 30 days old), and assessed the cerebral weight and the body weight gain of the animals subchronically exposed to alkaloid. In the acute exposure, the rats received an intraperitoneal dose of 0, 0.5, 1 or 5 mg/kg of nicotine prepared in saline 150 mM. Ten minutes after exposure, the animals were anesthetized and killed by decapitation. Brain was removed, weighed, homogenized and centrifuged. Serum was obtained after centrifugation of the whole blood. In the subchronic exposure, two subcutaneous doses of 0, 0.5 or 1 mg/kg of nicotine were administered by day (altogether 0, 1 or 2 mg/kg/day, respectively), with 12 h intervals between doses, for a period of 15 or 30 days. The animals were weighed every two days and killed 12 h after the last injection in both periods of exposure. The spectrophotometric method of Ellman was used for

enzymatic activities determinations. The results showed that the cerebral acetylcholinesterase and serum cholinesterase activities were not changed by acute or subchronic exposure at nicotine. Moreover, there were not alterations in the body weight gain and in the cerebral weight of the animals after subchronic exposures. The absence of effect *ex vivo* may be related at least the two possibilities: low levels of nicotine reached *in vivo*; or a possible inhibition induced by low concentrations of the alkaloid (*in vivo*) may be reverted by substrate assayed *ex vivo*.

Key words: nicotine; acute and subchronic exposure; cerebral acetylcholinesterase; serum cholinesterase; body weight gain; cerebral weight.

1. Introdução:

A nicotina, um alcalóide natural presente nas folhas do tabaco, é o agente ativo farmacologicamente e responsável pela dependência ao tabaco (Sohn e col., 2003). Ela apresenta uma farmacologia muito complexa, visto que os receptores colinérgicos desempenham muitas funções com diferentes níveis de atividade e distribuição em diferentes partes do corpo (Anthony e col., 1995; Benowitz, 2003). A ampla disponibilidade em vários produtos à base de tabaco e em certos pesticidas faz da nicotina uma fonte de considerável toxicidade sobre os sistemas nervoso central e periférico, causando uma grande variedade de alterações fisiológicas (Graeff, 1989; Anthony e col., 1995; Yildiz, 2004).

Em humanos, os efeitos da nicotina parecem ser influenciados pela quantidade absorvida, via de administração e desenvolvimento de tolerância ao alcalóide (Benowitz, 1996). Esta substância vem sendo investigada no tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, síndrome de Tourette, e em déficit de atenção e melhora da memória. No entanto, estes dados ainda permanecem controversos (Benowitz, 1996).

A habilidade da nicotina em produzir efeitos neurológicos e comportamentais mais pronunciados em adolescentes provavelmente se origina do fato de que o desenvolvimento cerebral ainda continua neste período (Trauth e col., 2000). O cérebro de adolescentes encontra-se em transição e difere anatomicamente e neuroquimicamente do cérebro de um adulto. Em ratos, o período equivalente à adolescência em humanos está

compreendido entre o 28^o e 42^o dias de vida (Spear, 2000). Estudos demonstram que a exposição de ratos adolescentes à nicotina pode afetar o sistema colinérgico central, em associação com dano e perda celular (Trauth e col., 2000).

A acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) é uma glicoproteína globular predominantemente encontrada na junção neuromuscular, membranas de eritrócitos e no sistema nervoso central (SNC) (Massoulié e col., 1993). Neste último, a enzima controla a transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas por hidrolisar o neurotransmissor excitatório acetilcolina (ACh), interrompendo sua ação (Taylor e Brown, 1993). Devido à sensibilidade desta enzima a vários agentes tóxicos, sua atividade vem sendo considerada como um importante marcador de exposição e/ou intoxicação por estes agentes (Taylor e Brown, 1993; Taylor, 1996; Anthony e col., 1995).

Em relação à nicotina, Chang e col. (1973) verificaram que a exposição crônica de ratos a este alcalóide por um período de oito semanas causa uma diminuição na atividade da AChE de algumas regiões cerebrais. A redução desta atividade foi ainda maior quando o tratamento estendeu-se por dezesseis semanas. Armitage e col. (1968), demonstraram um aumento na produção de ACh no cérebro de ratos após administração de nicotina.

Com base nestas observações, a elucidação dos efeitos da nicotina sobre a atividade da AChE fornecerá dados importantes para

uma possível compreensão de sua ação sobre o sistema colinérgico, principalmente quando considerado que a adolescência representa um estágio do desenvolvimento cerebral em que a vulnerabilidade aos efeitos da nicotina parece ser diferente dos demais (Trauth e col., 2000). Assim, com o objetivo de caracterizar os efeitos do alcalóide em ratas adolescentes, examinou-se o efeito da administração aguda e subcrônica de nicotina sobre a atividade da AChE cerebral e colinesterase (ChE) sérica e avaliaram-se os efeitos sobre o peso cerebral e o ganho de peso corporal dos animais.

2. Material e Métodos:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (Registro nº : 23081.014035/2004-49).

Foram usadas ratas Wistar com idade em torno de 30 dias e pesando entre 70-100 g. Grupos de 5 animais foram acondicionados sob condições controladas de luz e temperatura e receberam água e comida *ad libitum*.

Na exposição aguda as ratas receberam uma dose intraperitoneal (i.p.) de 0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg de nicotina (Sigma-Aldrich®) preparada em salina 150 mM (NaCl, Reagen). Após 10 min, os animais foram anestesiados e mortos por decapitação.

Na exposição subcrônica, doses de 0, 0,5 ou 1,0 mg/kg de nicotina foram administradas subcutaneamente (s.c.) duas vezes ao dia (totalizando 0, 1,0 ou 2,0 mg/kg/dia, respectivamente), com intervalo de 12 horas entre as injeções, durante 15 ou 30 dias. Os animais foram observados por 20 min após cada injeção e as possíveis alterações registradas. A pesagem dos animais foi realizada a cada dois dias para ambos os intervalos de exposição (15 ou 30 dias). Os animais expostos por 15 ou 30 dias foram anestesiados e mortos por decapitação 12 horas após a última injeção.

Após o sacrifício, os cérebros foram imediatamente removidos e o sangue coletado. O tecido cerebral foi pesado e homogeneizado em 10 volumes de solução tampão Tris-HCl (Sigma Chemical Co) 10 mM, pH 7,2 contendo sacarose (Vetec) 160 mM. O homogeneizado de cérebro e o sangue foram centrifugados a 1.000 g em centrífuga refrigerada (Hitachi Refrigerated Centrifuges-Himac 21E) durante 15 min para fornecer o sobrenadante (fração S1) e o soro, respectivamente. Alíquotas da fração S1 e de soro foram usadas como fonte enzimática.

As atividades da AChE cerebral e da ChE sérica foram determinadas por modificação do método espectrofotométrico de Ellman e col. (1961) como previamente descrito por Pereira e col. (2004). Após pré-incubação de 2 min, a reação foi iniciada pela adição de acetiltiocolina (ATC; Sigma Chemical Co) e a velocidade da reação foi medida pelo aumento da absorbância em 412 nm a 30°C. O meio de reação continha

tampão fosfato de potássio (Reagen) 0,024 M, pH 7,2, para cérebro e tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,2, para soro; 1 mM de ácido 5,5-ditiobisnitrobenzóico (DTNB; Sigma Chemical Co) e 50 μ L de material enzimático [fração S1 (3-6 mg de proteína/mL) ou soro (30-60 mg de proteína/mL)].

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Bradford (1976), utilizando Coomassie azul brilhante G (Sigma Chemical Co) como reagente de cor e albumina sérica bovina (Reagen) como padrão.

A atividade específica foi expressa em μ mol de substrato hidrolisado por hora por mg de proteína para ambas as fontes enzimáticas.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão e analisados por ANOVA de uma ou duas vias, ou por MANOVA. As análises foram realizadas usando o Software Statistical Package for Sciences (SPSS).

3. Resultados:

Tratamento agudo:

A atividade da AChE cerebral e da ChE de soro de ratas estão demonstradas nas Figuras 1 e 2. A análise de variância de uma via (ANOVA) revelou que o tratamento com nicotina (0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg i.p.) não alterou as atividades enzimáticas de cérebro e soro destes animais.

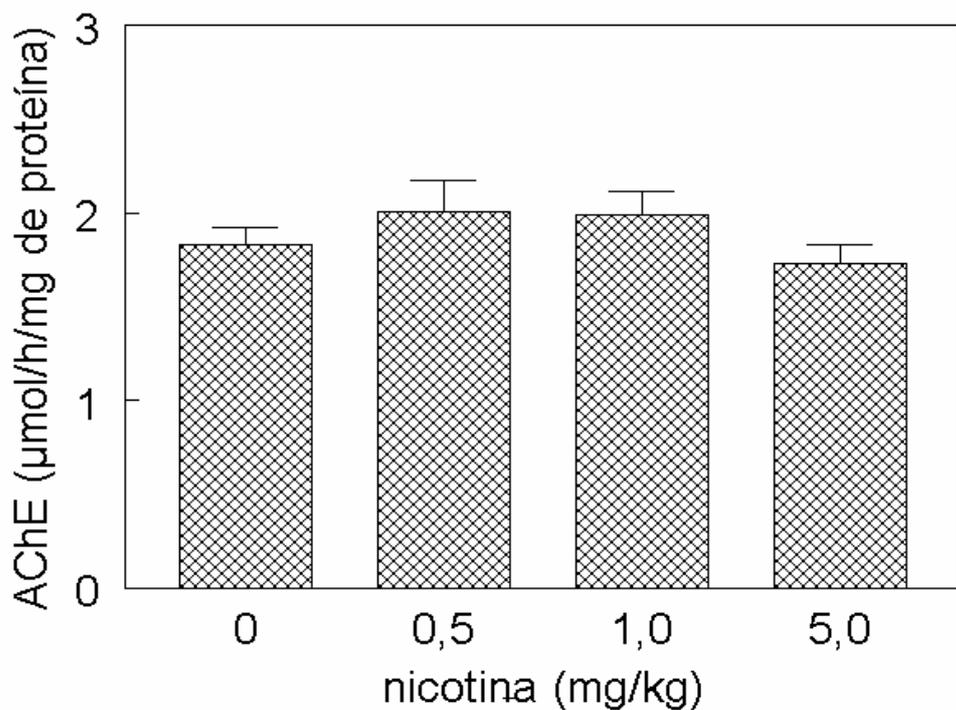


Figura 1. Atividade da AChE cerebral de ratas expostas agudamente à nicotina. Os animais receberam uma dose de 0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg nicotina (i.p.). A atividade da enzima está expressa em μmol de ATC hidrolisado/h/mg de proteína. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 3 preparações enzimáticas.

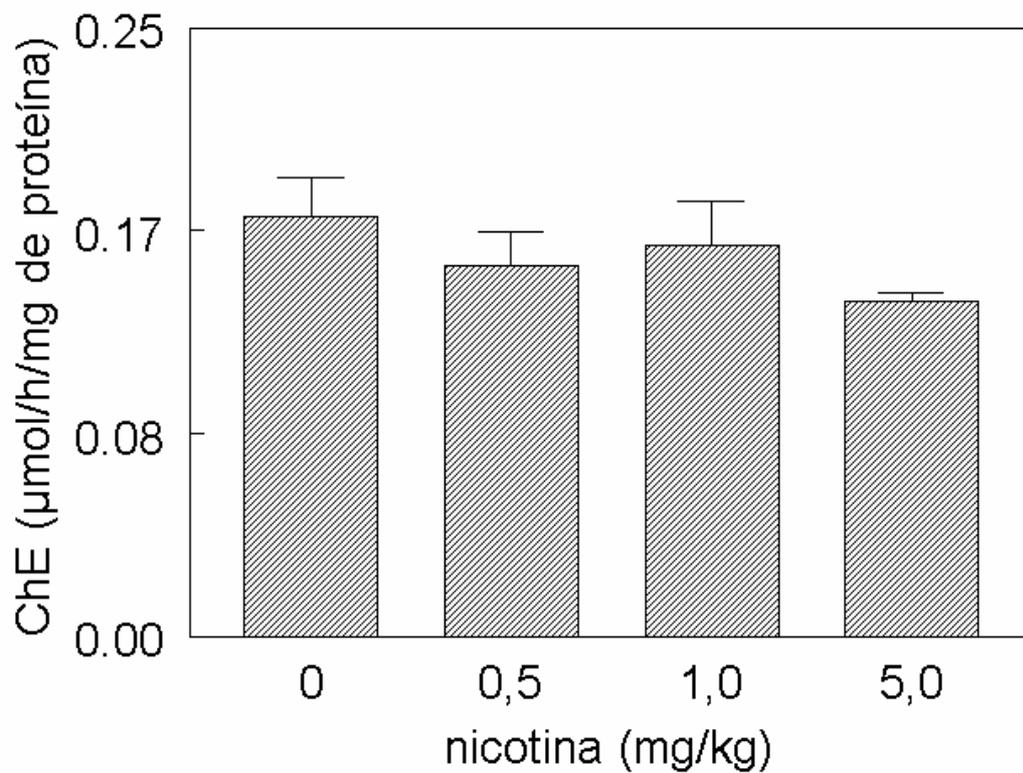


Figura 2. Atividade da ChE sérica de ratas expostas agudamente à nicotina. Os animais receberam uma dose de 0, 0,5, 1,0 ou 5,0 mg/kg nicotina (i.p.). A atividade da enzima está expressa em μmol de ATC hidrolisado/h/mg de proteína. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 3 preparações enzimáticas.

Tratamento subcrônico:

As atividades da AChE cerebral de ratas expostas por 15 ou 30 dias à nicotina (0, 1,0 ou 2,0 mg/kg/dia s.c.) estão apresentadas na figura 3. A análise de variância de duas vias [tratamento X intervalo] revelou efeito significativo do intervalo de tratamento [$F(1,15)=6,77$; $P<0,02$], mas sem apresentar efeito da dose e tampouco interação entre a dose e o intervalo de tratamento. O efeito do intervalo de tratamento foi devido ao fato de que, para todas as doses, o material enzimático obtido dos animais tratados por 30 dias apresentou atividades ligeiramente menores que aquelas apresentadas pelos animais tratados por 15 dias. Com relação à atividade da ChE de soro, não houve efeito significativo do intervalo de tratamento, das doses e interação entre dose e intervalo de tratamento (Figura 4).

A Figura 5 mostra as curvas de ganho de peso corporal dos animais tratados por 15 dias. A MANOVA (crescimento X intervalo de tratamento) demonstrou que há efeito do crescimento [$F(7,84)=52,14$; $P<0,001$]. A curva de ganho de peso corporal dos animais tratados durante 30 dias é apresentada na Figura 6. A MANOVA revelou efeito significativo do crescimento [$F(11,132)=561,40$; $P<0,001$].

Em relação aos pesos de cérebro, a ANOVA de uma via revelou que não há diferença significativa entre os grupos tanto para os animais expostos por 15 (0 mg/kg/dia = $1,7117g \pm 0,024$; 1,0 mg/kg/dia = $1,7279g \pm 0,055$; e 2,0 mg/kg/dia = $1,6731g \pm 0,046$) ou 30 dias (0 mg/kg/dia =

1,7504 ± 0,058; 1,0 mg/kg/dia = 1,7996g ± 0,037; e 2,0 mg/kg/dia =
1,7663g ± 0,028) à nicotina.

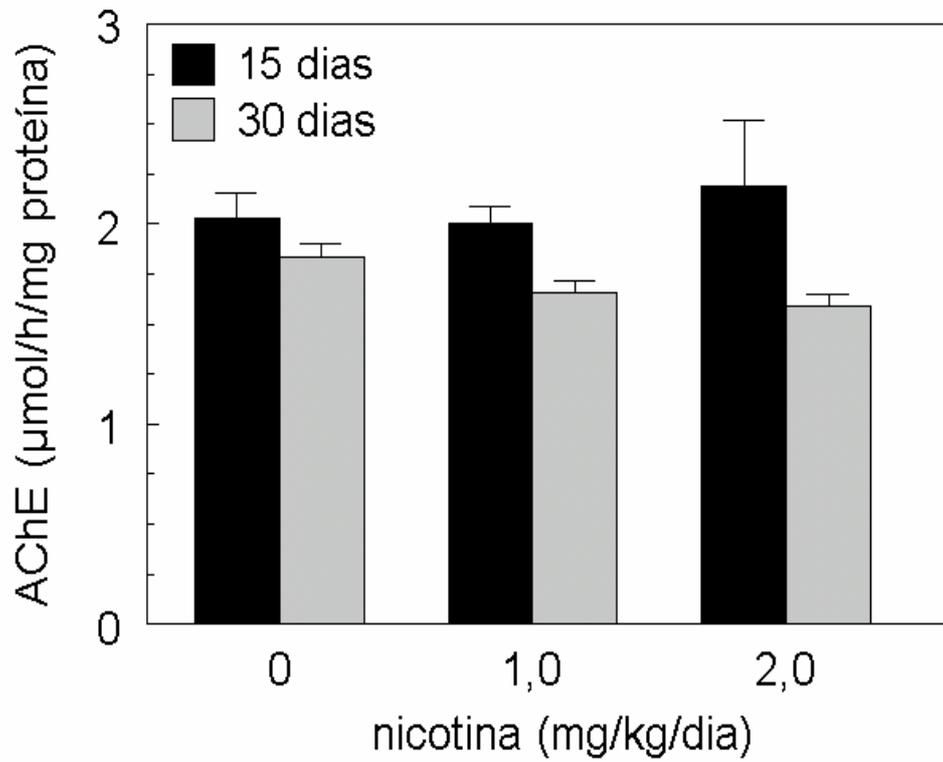


Figura 3. Atividade da AChE cerebral de ratas expostas por 15 ou 30 dias à nicotina. As ratas receberam 0, 1,0 ou 2,0 mg/kg/dia de nicotina, s.c. A atividade da enzima está expressa em μmol de ATC hidrolisado/h/mg de proteína. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 3 preparações enzimáticas.

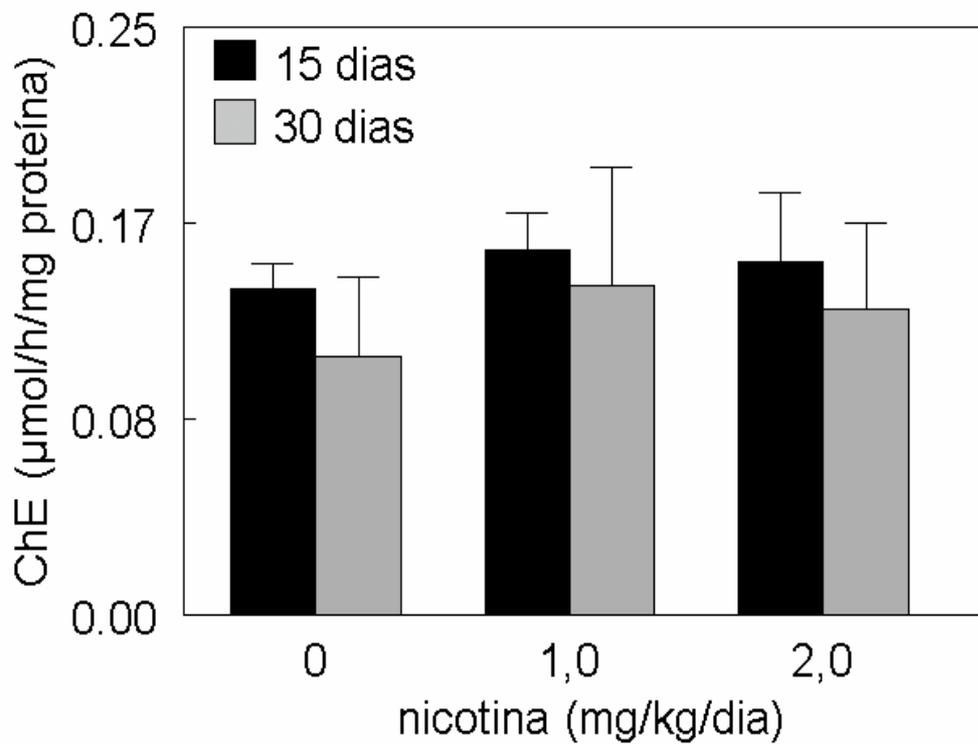


Figura 4. Atividade da ChE sérica de ratas expostas por 15 ou 30 dias à nicotina. As ratas receberam 0, 1,0 ou 2,0 mg/kg/dia de nicotina, s.c. A atividade da enzima está expressa em μmol de ATC hidrolisado/h/mg de proteína. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão de 3 preparações enzimáticas.

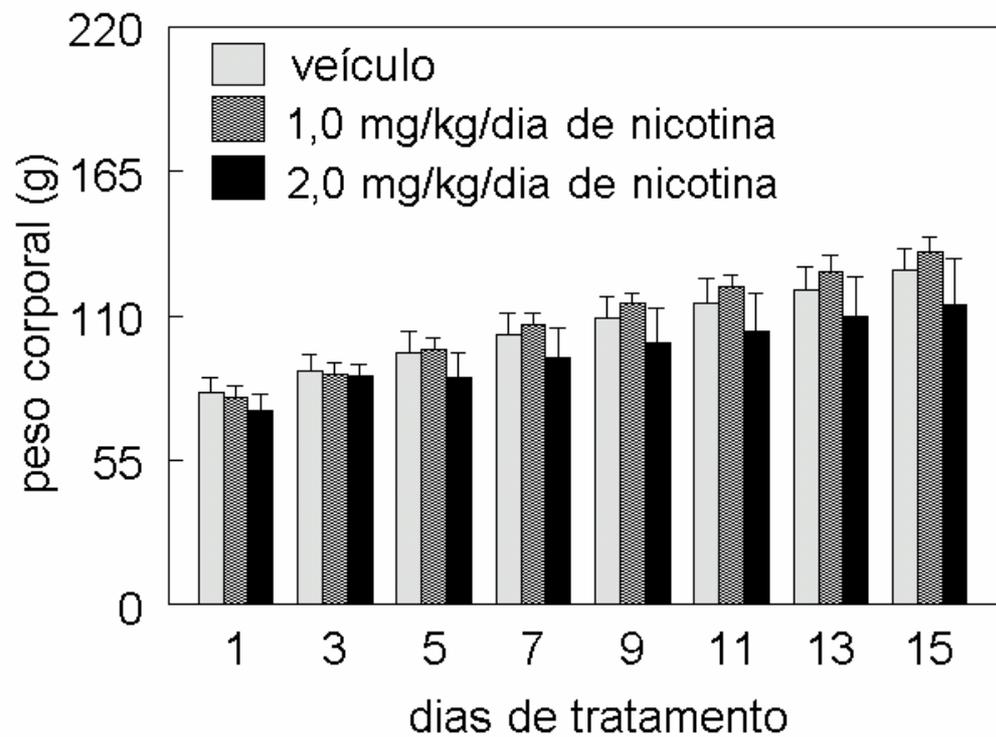


Figura 5. Ganho de peso corporal de ratas expostas por 15 dias à nicotina. Os animais foram tratados como descrito na figura 3. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 5 ratas por grupo.

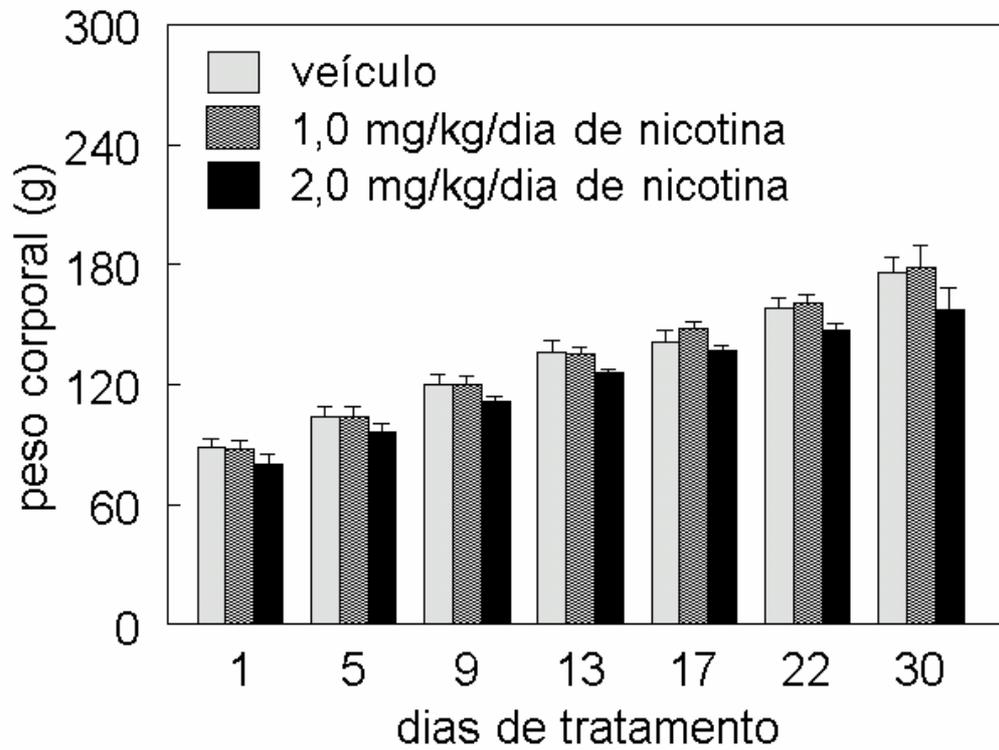


Figura 6. Ganho de peso corporal de ratas expostas por 30 dias à nicotina. Os animais foram tratados como descrito na figura 3. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 5 ratas por grupo.

4. Discussão:

O objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos da administração aguda e subcrônica de nicotina sobre as atividades da AChE cerebral e ChE sérica, e sobre os pesos corporal e cerebral de ratas Wistar adolescentes.

Os animais tratados subcronicamente por 15 ou 30 dias, após receberem nicotina nas doses de 1 e 2 mg/kg/dia (principalmente nesta última), apresentaram sinais neurológicos observados por inspeção visual a partir 10^o dia até o término da exposição, com sinais de maior intensidade após a primeira dose do dia. As ratas apresentaram atonia acentuada, movimentos em círculo e, em alguns casos, episódios convulsivos. Estes sinais neurológicos e episódios possivelmente hipóxicos-isquêmicos em ratos também foram observados por Trauth e col. (2000) após injeções subcutâneas de nicotina.

Em relação às enzimas estudadas, os resultados deste estudo demonstram que as atividades da AChE cerebral e ChE sérica não foram alteradas pela exposição aguda ou subcrônica à nicotina; além disso, não houve alteração no ganho de peso corporal, tampouco no peso cerebral dos animais. Estudos prévios [Pereira e col., 2005 (*submetido à publicação*)] tem demonstrado que a nicotina parece exercer efeito inibitório competitivo, *in vitro*, sobre a atividade da AChE em amostras de cérebro de ratas, sangue humano e enzima purificada. A diferença entre os resultados *in vitro* e os obtidos no presente

trabalho, pode ter ocorrido em virtude de que, *in vivo* os níveis circulantes de nicotina possam ser insuficientes para a enzima apresentar-se inibida *ex vivo*. Segundo Slotkin (2004) e Trauth e col. (2000b) a dose de 2 mg/kg/dia, isto é, a dose diária máxima utilizada na exposição subcrônica no presente trabalho, já seria suficiente para reproduzir níveis plasmáticos de nicotina (\pm 25 ng/mL) necessários para desencadear efeitos sobre o SNC similares aos apresentados por fumantes moderados.

Alguns fatores podem, ainda, interferir nos níveis circulantes de nicotina: idade, sexo, raça e/ou estado hormonal do animal (Trauth e col., 2000). Além disso, uma possível inibição da enzima *in vivo*, pode ter sido revertida *ex vivo*, pela competição entre a nicotina e a necessidade de utilização de substrato em concentrações saturantes no ensaio enzimático.

Em relação ao peso corporal e cerebral, a exposição à nicotina não alterou estes parâmetros. De fato, apenas pequena redução do ganho peso corporal foi verificada em animais tratados com a dose de 6 mg/kg/dia de nicotina (Trauth e col., 1999), isto é, três vezes maior do que a dose máxima utilizada neste estudo.

Os efeitos da nicotina em fêmeas parecem ser menos persistentes ou demoram mais para aparecer do que em machos (Trauth e col., 1999, 2001). Assim, o prolongamento da exposição e/ou a utilização de menores concentrações de substrato nos ensaios

enzimáticos *ex vivo* poderiam esclarecer a ausência de efeito da nicotina neste estudo.

5. Referências:

ANTHONY, D. C., MONTINE, T.J., GRAHAM, D. G. Toxic responses of the nervous system. In: Casarett & Doull's toxicology the basic science of poisons. Ed. C. D. Klaassen: 1995. Kansas, USA, p. 463-486.

ARMITAGE, A. K., HALL, G. H., MORRISON, C. F. – Pharmacological basis for the tobacco smoking rabbit. *Nature*, v. 217, p. 331-334, 1968.

BENOWITZ, N. L. - Basic cardiovascular research and its implications for the medicinal use of nicotine. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v. 41, p. 497-498, 2003.

BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANG, P.-L., BHAGAT, B., TAYLOR, J. J. - Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. *Brain Res.*, v. 54, p. 75-84, 1973.

- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JR., V., FEATHERSTONE, R. M. - A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- GRAEFF, F.G. Abuso e dependência de drogas. In: *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. Ed. F.G. Graeff: 1989. São Paulo, p. 101-135.
- LEFKOWITZ, R. J., HOFFMAN, B. B., TAYLOR, P. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed. J. G. Hardman, A. G. Gilman & L. E. Limbird: 1996. New York, USA, p. 105-140.
- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, F. - M. - Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.*, v. 41, p. 31-91, 1993.
- PEREIRA, M. E., ADAMS, A. I. H., SILVA, N. S. - 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.*, v. 146, p. 269-274, 2004.
- PEREIRA, M. E., FIGUEIRÓ, M., SÔNEGO, F., DÖRR, F. A., JÔSÉ, A. S. - Sensitivity of acetylcholinesterase from different sources in vitro by nicotine. *Toxicol. invitro*, 2005 [submitted for publication].
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. - *Farmacologia*. Rio de Janeiro. Elsevier, 2004.

- SLOTKIN, T. A. – Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 198, p. 132-151, 2004.
- SOHN, M., HARTLEY, C., FROELICHER, E. S., BENOWITZ, N. L. - Tobacco use and dependence. *Sem. Oncol. Nurs.*, v. 19, p. 250-260, 2003.
- SPEAR, L. P. – The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 24, p. 417-463, 2000.
- TAYLOR, P., BROWN, J. H. Acetylcholine. In: *Basic Neurochemistry*. Ed. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers & P. B. Molinoff: 1993. New York, USA, p. 231-260.
- TRAUTH, J. A., SEIDLER, F. J., McCOOK, E. C., SLOTKIN, T. A. – Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain Res.*, v. 851, p. 9-19, 1999.
- TRAUTH, J. A., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A. – An animal model of adolescent nicotine exposure: effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain Res.*, v. 867, p. 29-39, 2000.

TRAUTH, J. A., McCOOK, E. C., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A. – Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Res.*, v. 873, p. 18-25, 2000.

TRAUTH, J. A., SEIDLER, F. J., SLOTKIN, T. A. – Persistent and delayed behavioral changes after nicotine treatment in adolescent rats. *Brain Res.*, v.880, p. 167-172, 2000b.

TRAUTH, J. A., SEIDLER, F. J., ALI, S., SLOTKIN, T. A. – Adolescent nicotine exposure produces immediate and long-term changes in CNS noradrenergic and dopaminergic function. *Brain Res.*, v. 892, p. 269-280, 2001.

YILDIZ, D. - Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.*, v. 43, p. 619-632, 2004.

5. DISCUSSÃO GERAL:

A nicotina é considerada uma droga legal. Contudo, em termos de impacto a saúde, há a necessidade de controlar seu uso e conhecer seus efeitos para uma possível compreensão de sua ação.

Sua ampla disponibilidade em produtos à base de tabaco faz da nicotina uma fonte de considerável toxicidade sobre os sistemas nervoso central e periférico, causando uma variedade de alterações fisiológicas (Graeff, 1989; Anthony et al., 1995; Yildiz, 2004).

Dentre as enzimas cuja atividade vem sendo considerada como um importante marcador de exposição e/ou intoxicação por vários agentes tóxicos, está a acetilcolinesterase (AChE) (Taylor & Brown, 1993; Taylor, 1996; Anthony *et al.*, 1995). Sabendo-se dos múltiplos efeitos da nicotina sobre o sistema colinérgico (Bewnowitz, 1996), estudar estes efeitos sobre a atividade da AChE ajudará na compreensão da ação da nicotina sobre este sistema.

O presente trabalho demonstrou que a atividade da AChE de cérebro de ratas, sangue humano e purificada de órgão elétrico de enguia, é inibida pela nicotina *in vitro*. Nas menores concentrações testadas, a nicotina parece competir com o substrato pela ligação ao sítio catalítico da enzima, visto que o K_m apresentou-se aumentado e o V_{max} não foi modificado pelo alcalóide. Nas maiores concentrações, novamente o fator competitivo está presente na inibição, uma vez que a diminuição de V_{max} ocorre concomitantemente ao aumento de K_m (Segel,

1975). A eficiência de hidrólise (EH) obtida para as três fontes enzimáticas foi reduzida pela nicotina. Contudo, como o V_{max} não foi modificado por baixas concentrações deste alcalóide, o efeito sobre a EH foi devido a um aumento de K_m , sugerindo a provável redução no número de moléculas de enzima disponíveis para hidrolisar o substrato. Com relação à sensibilidade da AChE cerebral, sangüínea e purificada à nicotina, os resultados demonstram uma similaridade de efeitos, visto que os valores de IC_{50} para a nicotina nas três fontes foram da mesma ordem de magnitude. Estes resultados sugerem que a similaridade de efeitos produzidos pela nicotina *in vitro* pode ser devido à predominância da mesma forma molecular da AChE em ambas as fontes enzimáticas (Brimijoin, 1979; Skau, 1986; Massoulié *et al.*, 1993), podendo sugerir ainda a importância desta enzima como um possível marcador de exposição ou contaminação à nicotina [Capítulo 1].

Com relação aos efeitos da nicotina sobre a atividade da AChE de regiões específicas do cérebro de ratas, ricas em inervações colinérgicas (estriado, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e cerebelo) (Trauth *et al.*, 1999; Trauth *et al.*, 2000), os resultados reportaram o efeito inibitório similar da nicotina para todas regiões estudadas. Entretanto, de acordo com o IC_{50} , apesar do efeito inibitório ter sido similar entre as estruturas, a enzima de estriado e córtex foi mais sensível e a de hipotálamo menos sensível ao alcalóide. As constantes cinéticas calculadas de acordo com o método de Michaelis-Menten para estriado, córtex e hipotálamo

demonstraram que a nicotina induz um aumento de K_m e diminuição de V_{max} . Estes resultados sugerem que o aumento da concentração de substrato não foi suficiente para recuperar a velocidade da reação, mesmo na presença das menores concentrações de nicotina, caracterizando desta forma uma inibição do tipo mista (Segel, 1975). Assim, embora haja diferenças nas atividades específicas da AChE conforme a estrutura, as características da inibição induzida pela nicotina são similares, provavelmente como consequência da presença da mesma forma molecular globular da AChE nas regiões cerebrais estudadas (Capítulo 2).

Quanto à sensibilidade da AChE de ratas expostas à nicotina, os resultados demonstraram que as atividades da AChE cerebral e da ChE sérica não foram alteradas pela exposição aguda ou subcrônica ao alcalóide. Além disso, não houve alteração no ganho de peso corporal e peso cerebral dos animais. Diversos fatores podem estar relacionados a ausência de efeitos da nicotina sobre as atividades enzimáticas *ex vivo*, destacando-se: níveis baixos de nicotina atingidos *in vivo*; e, uma possível inibição enzimática presente *in vivo* induzida pelos tratamentos, mas revertida pelo excesso de substrato ensaiado *ex vivo*, uma vez que o efeito inibitório da nicotina *in vitro* sobre a AChE possui um componente competitivo (Capítulo 3).

Com base nos dados obtidos neste trabalho, um avanço foi feito ao se estudar os efeitos da nicotina sobre a atividade da AChE tanto *in vitro*

quanto *ex vivo*, visto a importância de compreender a sua ação sobre o sistema colinérgico. Vale ressaltar que dados complementares são necessários, como a avaliação da sensibilidade das diferentes formas moleculares da AChE à nicotina; prolongamento da exposição; e, ainda a utilização de menores concentrações de substrato nos ensaios enzimáticos a fim de esclarecer a ausência de efeito da nicotina demonstrada *ex vivo*.

6. CONCLUSÕES:

Tendo-se em vista os objetivos do presente trabalho, pode-se concluir que:

- A atividade da AChE de cérebro de ratas, sangue humano e purificada de órgão elétrico de enguia, foi inibida pela nicotina;
- AChE purificada foi mais sensível aos efeitos inibitórios da nicotina, seguida pela AChE cerebral e sangüínea;
- Nas menores concentrações de nicotina, obteve-se um aumento dos valores de K_m sem modificação dos de V_{max} para a AChE cerebral, sangüínea e purificada, caracterizando uma inibição do tipo competitiva; com o aumento da concentração do alcalóide, além das alterações sobre a K_m , os valores de V_{max} para a AChE cerebral e purificada foram diminuídos, caracterizando uma inibição do tipo mista;
- A diminuição da EH obtida para a AChE das três fontes acima citadas, provavelmente ocorreu pelo aumento de K_m , já que o V_{max} não foi modificado por baixas concentrações do alcalóide, sugerindo uma provável redução no número de moléculas de enzima disponíveis para hidrolisar o substrato;
- As atividades da AChE de córtex, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo foram inibidas pela nicotina. Apesar das atividades basais da AChE diferirem entre as estruturas, estas parecem ter sensibilidade semelhantes no que se refere à inibição pela nicotina,

embora as atividades enzimáticas de estriado e córtex tenham sido ligeiramente mais sensíveis e a de hipotálamo menos sensível ao alcalóide;

- Os efeitos da nicotina (aumento do K_m e diminuição de V_{max}) sobre as atividades da AChE de estriado, córtex e hipotálamo, sugere uma inibição do tipo mista;
- Finalmente, a exposição aguda ou subcrônica dos animais à nicotina não foi capaz de induzir alterações nas atividades da AChE cerebral e ChE sérica *ex vivo*. A exposição também não alterou o ganho de peso corporal e o peso cerebral dos animais expostos por 15 ou 30 dias a nicotina;
- Devido aos diferentes efeitos da nicotina *in vitro* e *ex vivo*, outros estudos são necessários para melhor elucidar o mecanismo inibitório da nicotina sobre a enzima AChE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BENOWITZ, N.L., 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. **Ann. Rev. Pharmacol.**, 36, pp. 597-613.
- BENOWITZ, N.L., 1999. Nicotine addiction. **Prim. Care**, 26, pp. 611-631.
- BENOWITZ, N. & JACOB P III., 2003. Nicotine renal excretion rate influences nicotine intake during cigarette smoking. In: Sohn, M., Hartley, C., Froelicher, E. S. & Benowitz, N. L. Tobacco use and dependence. **Sem. Oncol. Nurs.**, 19, pp. 250-260.
- BRIMIJOIN, S., 1979. Axonal transport and subcellular distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rabbit sciatic nerve. **Mol. Pharmacol.**, 15, pp. 641-648.
- CHANG, P.-L., BHAGAT, B. & TAYLOR, J. J., 1973. Effect of chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain. An ultrastructural study. **Brain Res.**, 54, pp. 75-84.
- DEVOR, E.J. & ISENBERG, K.E., 2004. Nicotine and Tourettes syndrome. In: Yildiz, D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. **Toxicol.**, 43, pp. 619-632.
- FROED, H.C. & WILSON, I.B., 1996. Anticholinesterase agents. In: Hardman, J.G., Gilman, A.G. & Limbird, L.E. (Ed.). **The**

Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 161-176.

- GOYAL, R.K., 2004. Muscarinic receptor subtypes: physiology and clinical implications. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (Ed.). **Farmacologia.** Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 153-181.
- LAUDER, J.M. & SCHAMBRA, U.B., 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. **Environ. Health Perspect.**, 107, pp. 65-69.
- LEFKOWITZ, R. J., HOFFMAN, B. B. & TAYLOR, P., 1996. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman, J.G., Gilman, A.G. & Limbird, L.E. (Ed.). **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** McGraw-Hill, New York, USA, pp. 105-140.
- LENA, C. & CHANGEUX, J.P., 1998. Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor. In: Zevin, S., Gourlay, S.G. & Benowitz, N.L. Clinical Pharmacology of Nicotine. **Clin. Dermatol.**, 16, pp. 557-564.
- MALLENDER, W.D., SZEGLETS, T. & ROSENBERRY, T.L., 1999. Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the presence of peripheral site ligands: distinct effects of propidium and fasciculin. **J. Biol. Chem.**, 274, pp. 8491-9499.

- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, S. & VALLETTE, F.-M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog. Neurobiol.**, 41, pp. 31-91.
- MCGEHEE, D.S. & ROLE, L.W., 2003. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. In: Ilbäck, N.-G. & Stålhandske, T. Nicotine accumulation in the mouse brain is age-dependent and is quantitatively different in various segments. **Toxicol. Lett.**, 143, pp. 175-184.
- MOSS, G.P., 1996. Basic terminology of stereochemistry. In: Barreiro, E.J. & Fraga, C.A.M. (Ed.). **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed, Porto Alegre, Brasil, pp. 15-51.
- NACHMANSOHN, D. & WILSON, I.B., 1951. Enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. **Adv. Enzymol.**, 12, pp. 259-339.
- NICOLL, R.A., 1998. Introdução à Farmacologia das drogas do SNC. In: Katzung, B.G. (Ed.). **Farmacologia Básica & Clínica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 72-80.
- NUNES-TAVARES, N., MATTA, A.N., BATISTA E SILVA, C.M., ARAÚJO, G.M.N., LOURO, S.R.W. & HASSÓN-VOLOCH, A., 2002. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **Int. J. Biochem. & Cell Biol.**, 34, pp. 1071-1079.

- PETO, R., LOPEZ, A.D., BOREHAM, J., THUN, M., HEATH, C. & DOLL, R., 2004. Mortality from smoking worldwide. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (Ed.). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 676-695.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. & MOORE, P.K., 2004. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (Ed.). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 676-695.
- REAVILL, C., 2004. Action of nicotine on dopamine pathways and implications for Parkinson's disease. In: Yildiz, D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. **Toxicol**, 43, pp. 619-632.
- SKAU, K. A., 1985. Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, 80C, pp. 207-210.
- SLOTKIN, T.A., MCCOOK, E.C. & SEIDLER, F.J., 1997a. Cryptic brain cell injury caused by fetal nicotine exposure is associated with persistent elevations of *c-fos* protooncogene expression. **Brain Res.**, 750, pp. 180-188.

- SLOTKIN, T.A., 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 198, pp. 132-151.
- SMITH, E. L., HILL, R. L., LEHMAN, I. R., LEFKOWITZ, R. J., HANDLER, P. & WHITE, A. 1985. O sistema nervoso. In: Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P. & White, A. (Ed.). **Bioquímica de Mamíferos**.
- SOHN, M., HARTLEY, C., FROELICHER, E. S. & BENOWITZ, N. L., 2003. Tobacco use and dependence. **Sem. Oncol. Nurs.**, 19, pp. 250-260.
- SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L. & SILMAN, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, 253, pp. 872-879.
- SZEGLETS, T., MALLENDER, W.D., THOMAS, P.J. & ROSENBERRY, T.L., 1999. Substrate binding to peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochem.**, 38, pp. 122-133.
- TAYLOR, P. & RADIĆ, Z., 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 34, pp. 281-320.

- TAYLOR, P., 1996. Anticholinesterase agents. In: Hardman, J.G., Gilman, A.G. & Limbird, L.E. (Ed.). **The Pharmacologic Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 161-176.
- TAYLOR, P. & BROWN, J.H., 1999. Acetylcholine. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, pp. 214-242.
- WEINTRAUB, M.S., 1977. Toxicomanias(2) Aspectos Especiais. In: Corbett, C.E. (Ed.). **Farmacodinâmica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 313-315.
- WEISS, E.R., MANESS, P. & LAUDER, J.M., 2004. Why do neurotransmitters act like growth factors? In: Slotkin, T.A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 198, pp. 132-151.
- WESS, J., 2004. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. In: Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (Ed.). **Farmacologia**. Elsevier, São Paulo, Brasil, pp. 153-181.
- WESSLE, I., KILPATRICK, C.J. & RACKE, K., 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally-acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. **Pharmacol. Ther.**, 77, pp. 59-79.

- YILDIZ, D., 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. **Toxicol.**, 43, pp. 619-632.
- ZEVIN, S., GOURLAY, S.G. & BENOWITZ, N.L., 1998. Clinical Pharmacology of Nicotine. **Clin. Dermatol.**, 16, pp. 557-564.