

Análise das alterações lipídicas em hipocampo de ratos após o tratamento com lipopolissacarídeos e ouabaína

GARCIA, I.J.P.¹; KINOSHITA, P.F.²; SCAVONE, C.²; BARBOSA, L.A.¹; SANTOS, H.L.¹

RESUMO

O processo neuroinflamatório é caracterizado por resposta da microglia sobre ações no Sistema Nervoso Central (SNC) que possuem caráter semelhante de inflamação. Como modelo estudado de indução desse processo usa-se lipopolissacarídeos (LPS) que podem ativar diretamente a microglia e esta ativada libera uma gama de neurotoxinas que induz a inflamação e posteriormente a morte celular neuronal. A ouabaína, um glicosídeo cardiotônico, em concentrações elevadas aumenta a concentração de noradrenalina nas sinapses, pois diminui a recaptação desse neurotransmissor em células hipocámpais. Tratamentos com ouabaína promovem uma “downregulation” dos receptores de glutamato, indicando assim uma possível neuroproteção mediada por este digitálico. Os fosfolipídeos e gangliosídeos também possuem um importante papel em processos de sinalização intracelular, processo de neurotransmissão, na participação na proliferação celular, crescimento e neuroproteção. O presente projeto tem como objetivo avaliar as alterações lipídicas ocorridas em membranas de hipocampo de ratos após o tratamento com ouabaína e LPS.

Palavras-chave: LPS, Ouabaína, lipídeos, colesterol, neuroproteção.

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é a primeira linha de defesa contra lesões teciduais ou infecções, mas quando esse processo acontece de uma maneira

exacerbada pode se tornar uma lesão ainda maior do que a provocada pelo estímulo inicial¹. A neuroinflamação incorpora um aspecto de complexo celular de resposta que incluem a ativação de microglia e astrócitos. Essa ativação contribui para o aumento dos danos neuronais, onde a liberação de substâncias pró-inflamatórias e neurotoxinas acabam por potencializar a lesão².

Os lipopolissacarídios (LPS) são moléculas de estrutura extremamente complexa encontradas exclusivamente nas monocamadas externa da membrana externa das bactérias gram-negativas³. Conhecido pelo seu papel na ativação da resposta imune adaptativa, o LPS tem sido utilizado experimentalmente para estimular respostas inflamatórias, inclusive no sistema nervoso central⁴.

Tanto a microglia quanto os astrócitos expressam o receptor toll-like tipo 4 (TLR4), que faz parte da família de TLRs e que reconhece especificamente o LPS⁵. Em um primeiro momento, o LPS se associa com a proteína de ligação ao LPS e então com o CD14 presente na parte externa da membrana plasmática das células. Esse complexo LPS-CD14 promove a ativação do TLR4, levando à produção de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), além de ativar a transcrição de diversas enzimas geradoras de espécies reativas⁶. Estas citocinas pró-inflamatórias atuam como moduladores tanto na transmissão neuronal normal quanto anormal no cérebro⁷.

A ouabaína é um hormônio esteróide derivado da casca do ouabaio (*Acokanthera ouabaio*) e das sementes do estrofanto (*Strophantus gratus*), plantas também digitálicas, que podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais⁸. Uma clássica ação dos esteróides cardiotônicos relacionou-se ao efeito inibidor sobre o transporte ativo de Na⁺ e de K⁺ realizado pela enzima Na⁺, K⁺-ATPase⁹.

No sistema nervoso a ouabaína possui efeitos principalmente no hipotálamo. Este esteróide em concentrações elevadas aumenta a concentração de noradrenalina nas sinapses, pois diminui a recaptação

¹ Laboratório de Bioquímica Celular, Universidade Federal de São João del Rei, Campus Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil

² Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, USP, São Paulo, SP, Brasil

desse neurotransmissor em células hipocampais¹⁰. Efeitos da ouabaína sobre receptores NMDA no córtex aumentam a liberação de glutamato e conseqüentemente ocorre uma excitotoxicidade glutamatérgica via receptores NMDA, causando a morte dos neurônios. O tratamento com ouabaína promove uma “*downregulation*” destes receptores de glutamato, indicando assim uma possível neuroproteção mediada por este digitálico¹¹.

Os lipídios de membrana do sistema nervoso central são representados principalmente por gangliosídios, fosfolipídios e colesterol¹². Os lipídeos no cérebro também possuem um papel em processos de sinalização intracelular, podendo destacar sua participação na neurotransmissão, proliferação celular, crescimento e neuroproteção¹³.

O colesterol é componente lipídico essencial para membranas biológicas, pois age estruturalmente, modulando propriedades físico-químicas e contribuindo para formação de microdomínios de membranas através de modificações no comportamento e na função de algumas proteínas de membrana¹⁴.

O presente trabalho tem como objetivo investigar possíveis alterações bioquímicas ocorridas em membranas obtidas de hipocampo de ratos tratados com ouabaína e LPS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de fração de membrana de hipocampo de ratos que receberam tratamento com ouabaína e lipopolissacarídeo foram cedidas pelo Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof.Dr. Cristoforo Scavone.

Os animais foram divididos em quatro grupos que receberão uma administração intraperitoneal de salina ou ouabaína (1,8 µg/Kg) 20 minutos antes da administração de uma segunda injeção de salina estéril livre de pirógenos (Hospital das Clínicas), ou de LPS (*Escherichia Coli* 0111:B4 Sigma#L-2630) dissolvido em salina, correspondendo a uma dose de 200 µg/Kg. Todas as administrações foram feitas no período da manhã.

Ao decorrer 120 minutos após a administração do LPS¹⁵. Os animais foram sacrificados por decapitação e o cérebro foi rapidamente retirado em solução fria de tampão-fosfato.

Determinou-se a concentração de proteínas totais utilizando a soroalbumina bovina (BSA) como padrão¹⁶.

Retirou-se uma alíquota da amostra para a realização da extração dos lipídeos¹⁷. Foi determinada a concentração do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise dos fosfolipídios¹⁸.

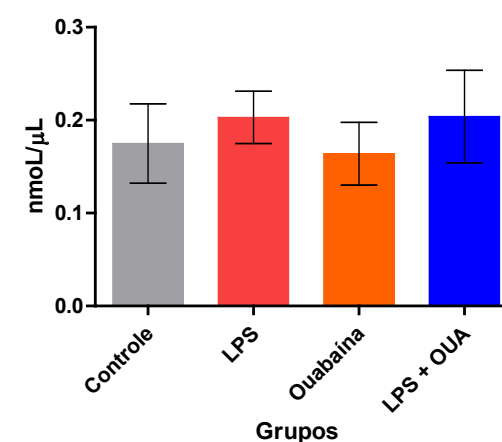
Determinou-se a concentração de colesterol total¹⁹.

Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5 para expressar os valores como média ± Erro Padrão da Média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguido com pós-teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

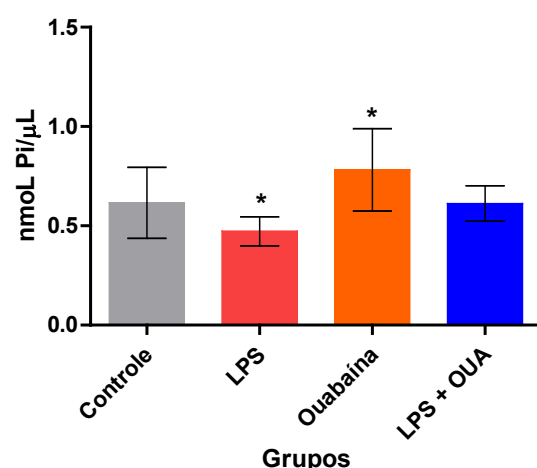
Encontraram-se alterações não significativas na determinação de colesterol total (figura 1).

Figura 1: Concentração de Colesterol total



Já na determinação de fosfato liberado pela hidrólise de fosfolipídios encontrou-se uma redução significativa de 23,75 % nos grupos de tratados com LPS e um aumento de 26,33 % no grupo tratado com ouabaína (figura 2).

Figura 2: Concentração de Pi total



Esses resultados demonstram que o LPS causa alteração na membrana plasmática podendo ser uma das causas de morte celular neuronal, em contrapartida a administração de ouabaína impede essa perda de fosfolipídios causando assim uma neuroproteção contra processo neuroinflamatórios.

CONCLUSÕES

Os fosfolipídios e colesterol são componentes estruturais de membrana e é necessária para viabilidade e proliferação celular e também está envolvida na fluidez, a permeabilidade iônica, tráfico de membrana, formação de mielina. Os dados obtidos mostraram que há um aumento e uma diminuição de fosfolipídios, após tratamento de ouabaína e LPS, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. NATHAN, C (2002) Points of control in inflammation. **Nature**, 420:846-852.
2. AKIYAMA H, BARGER S, BARNNUM S, BRADT B, Bauer J, COLE GM, COOPER NR, EIKELBOOM P, EMMERLING M, FIEBICH BL, FINCH CE, FRAUTSCHY S, GRIFFIN WST, HAMPEL H, HULL M, LANDRETH G, LUE L-F, MRAK R, MACKENZIE IR, O'BANION MK, PACTER J, PASINETTI G, PLATA-SALAMAN C, ROGERS J, RYDEL R, SHEN Y, STREIT W, STROHMEYER R, TOYOMA I, VAN MUISWINKEL FL, VEERHUIS R, WALKER D, WEBSTER

3. COLLINS, P.M.; FERRIER, R.J. (1995) **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**, p. 463 - 524, Ed. John Wiley & Sons.
4. HAUSS-WEGRZYNIAC, B., LUKOVIC, L., BIGAUD, M., STOECKEL, M.E. (1998) Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. **Brain Research** 794, 211-224.
5. CARPENTIER, P.A., DUNCAN, D.S., MILLER, S.D. (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain, Behavior and Immunity** 22, 140-147.
6. COHEN, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** 420, 885-891.
7. MERRILL, J.E. (1992) Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. **Developmental Neuroscience** 14, 1-10.
8. BLAUSTEIN, M.P. (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{+2} stores and cell responsiveness. **Am. J. Physiol.**, 264: 1367-1387.
9. SKOU, J.C. and ESMANN, M. (1992). The Na,K-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, 24: 249-261
10. VATTA, M.; PEÑA, C.; FERNÁNDEZ, B. E. & LORES ARNAIZ, G. R. (2004). Endobain E, a brain Na^{+} , K^{+} -ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. **Life Sciences**, 76: 359-365.
11. REINÉS, A.; ZÁRATE, S.; CARMONA, C.; NEGRI, G.; PEÑA, C. & ARNAIZ, G. R. L. (2005). Endobain E, a brain endogenous factor, is present and modulates NMDA receptor in ischemic conditions. **Life Sci.**, 78: 245-252.
12. AGRANOFF, B.W.; HAJRA, A.K. Lipids. In SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B., (1993). **Basic Neurochemistry**, New York: Raven Press. P. 97-116.
13. OSBORNE SL, MEUNIER FA, SCHIAVO G (2001) **Neuron** 32:9-12.
14. SUZUKI, T. (2002) Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. **Neurosci. Res.** v.44, n.1, p.1- 9, set.
15. GLEZER I, MUNHOZ CD, KAWAMOTO EM, MARCOURAKIS T, AVELLAR MC, SCAVONE C. MK- 801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. **Neuropharmacology**. 2003;45(8):1120-9.
17. HARTREE, E.F (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analyt. Biochem.** 48:422-427.
18. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.226, p.497-509, 1957
19. CHEN, P.S.Jr.; TORIBARA. T.Y and WARNER, H. (1956). **Anal. Chem.** 28: 1756 1768.
20. HIGGINS, G. (1987) In "Biological Membranes". **Practical approach series** (Findly J.B.C. and Evans W.H. Editions) IRL Press Oxford- Washington D.C. pp 104-1037.