

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**A INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE LIPOPOLISSACARÍDEO
COMPROMETE O METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE
RATOS JOVENS**

Luciana Ritter

Porto Alegre, Novembro de 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**A INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE LIPOPOLISSACARÍDEO
COMPROMETE O METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÉREBRO DE
RATOS JOVENS**

Luciana Ritter

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Orientador

Dr. César Augusto João Ribeiro

Co-orientador

Porto Alegre, Novembro de 2011

Artigo escrito de acordo com as normas da revista
“International Journal of Developmental Neuroscience”

A injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo compromete o metabolismo energético em cérebro de ratos jovens

Luciana Ritter^a, Anelise Miotti Tonin^a, Bianca Seminotti^a, Lisiane Aurélio Knebel^a,
Moacir Wajner^{a,b}, Guilhian Leipnitz^a, César Augusto João Ribeiro^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bServiço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente: César Augusto João Ribeiro, Departamento de Bioquímica,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 -

Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 51 33085572. Fax:

+55 51 33085539, E-mail: cesar.ribeiro@ufrgs.com

RESUMO

Diversas evidências sugerem que a inflamação tem papel crítico na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas. Com o objetivo de avaliar o possível envolvimento de uma disfunção energética na neuroinflamação, no presente estudo investigamos os efeitos da injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo (LPS) (50 µg) sobre a viabilidade mitocondrial, as atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e de enzimas do ciclo do ácido cítrico, bem como das enzimas creatina quinase e Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos Wistar jovens 24 h após a administração do composto. A injeção de LPS reduziu o potencial redox mitocondrial (33 %), determinada pela redução da resazurina, bem como diminuiu a atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase (22 %), sem alterar as atividades das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e dos complexos II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons. Além disso, o LPS reduziu as atividades das enzimas creatina quinase e Na^+, K^+ -ATPase (20 %). Esses resultados indicam que o LPS compromete a função mitocondrial e reduz as atividades de importantes enzimas envolvidas na bioenergética e neurotransmissão em córtex cerebral. Nossos achados sugerem que a disfunção mitocondrial pode ser um dos mecanismos envolvidos no dano cerebral apresentado por pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas caracterizadas por neuroinflamação.

Palavras-Chave: Neuroinflamação, lipopolissacarídeo, metabolismo energético cerebral, creatina quinase, Na^+, K^+ -ATPase

Destaques da Pesquisa

- * Inflamação está associada com diversas doenças neurodegenerativas.
- * A injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS) induz neuroinflamação.
- * O LPS reduz a função mitocondrial e as atividades de importantes enzimas do metabolismo energético em cérebro de ratos.
- * O comprometimento no metabolismo energético pode estar associado à patogênese de doenças neurodegenerativas com envolvimento de neuroinflamação.

1. INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é considerada um mecanismo de proteção que isola a região do tecido cerebral danificada da área não lesionada, reparando a matriz extracelular e levando as células afetadas à morte (Correale e Villa, 2004). Por esse motivo, durante décadas o cérebro foi considerado um órgão “imunologicamente privilegiado” (Zipp e Aktas, 2006). Além disso, uma série de estudos bioquímicos recentes *in vitro* e *in vivo* têm revelado que a inflamação no sistema nervoso central constitui a principal defesa do cérebro contra danos e infecções em diversas condições fisiológicas ou patológicas.

A resposta inflamatória do sistema nervoso central ocorre com a invasão massiva de leucócitos, o que leva ao recrutamento e ativação de células imunológicas residentes. Todas as células neurais, incluindo a microglia, astrócitos, neurônios e oligodendrócitos participam da resposta inflamatória, sendo a microglia a mais importante mediadora desse processo. Ativada da mesma forma que os monócitos nos tecidos periféricos, elas constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e outras lesões ao tecido cerebral, liberando uma extensa variedade de mediadores pró e antiinflamatórios, tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Ainda que os mediadores antiinflamatórios possam contribuir para a neuroproteção, os mediadores pró-inflamatórios parecem participar ativamente na degeneração e morte de neurônios e estar envolvidos em diversos distúrbios neurológicos (Kerschensteiner et al., 2009; Rothwell e Strijbos, 1995).

Conhecido pelo seu papel na ativação da resposta imune adaptativa, o lipopolissacarídeo (LPS) é o constituinte predominante da membrana externa das bactérias gram-negativas. O LPS tem sido utilizado experimentalmente para estimular respostas inflamatórias, inclusive no sistema nervoso central (Hauss-Wegrzyniak et al.,

1998). Essa resposta é primeiramente mediada pela microglia, mas diversas evidências também sugerem uma importância crucial também dos astrócitos (Farina et al., 2007). 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 LPS (Carpentier et al., 2008). 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 reativas (Cohen, 2002). Estas citocinas pró-inflamatórias atuam como moduladores tanto na transmissão neuronal normal quanto anormal no cérebro (Merrill, 1992).

Pacientes portadores de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose múltipla, doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica, apresentam elevação nos níveis de citocinas e, portanto, estão associadas com neuroinflamação crônica. Estudos neuropatológicos e neuroradiológicos sugerem que a resposta inflamatória poderia ser o evento inicial na perda neuronal responsável pela progressão dessas doenças (Nagatsu e Sawada., 2006). A neuroinflamação crônica também está associada a um aumento na produção de espécies reativas causado pela microglia ativada, levando ao estresse oxidativo (Tanaka et al., 2006). Dessa forma, a liberação sustentada de mediadores inflamatórios resulta na perpetuação do ciclo inflamatório, caracterizado por ativação adicional de microglia, proliferação dessas células e liberação de mediadores inflamatórios.

Tecidos com alta demanda energética, como o cérebro, são mais susceptíveis a dano em situações de redução do metabolismo oxidativo (Heales et al., 1999). Neste contexto, a redução do metabolismo energético causado por disfunção mitocondrial

parece estar envolvida na patogênese de diversas condições neurológicas onde também há envolvimento de neuroinflamação, incluindo demência, isquemia cerebral, DA e DP (Blass, 2001; Brennan et al., 1985; Chinta e Andersen, 2006; Onyango e Khan, 2006; Schurr, 2002). Além disso, diversas evidências sugerem que inflamação de curta duração durante períodos críticos do desenvolvimento podem resultar em aumento na vulnerabilidade cerebral e periférica tardia (Hagberg e Mallard, 2005).

Considerando que o processo inflamatório e alterações no metabolismo energético parecem estar envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas, o presente trabalho investigou os efeitos da injeção intracerebroventricular (icv) do LPS, que representa um modelo de neuroinflamação, sobre importantes parâmetros de metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens. Os parâmetros avaliados foram função mitocondrial, atividades de enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC), dos complexos da cadeia de transporte de elétrons (CTE), da creatina quinase (CK) e da Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral de ratos jovens.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e Reagentes

Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de vida obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os ratos tiveram livre acesso à água e ração comercial padrão e foram mantidos em ciclo de 12:12 h de claro/escuro em sala de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Todos os experimentos foram realizados de acordo com “Principles of Laboratory Animal Care” (publicação da NIH 85-23, revisada em

1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co., São Paulo, Brasil.

2.2. Administração intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS)

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e colocados em um aparelho estereotáxico. Dois pequenos orifícios foram feitos no crânio para a microinjeção. Uma dose única de 50 µg de LPS (2 µL de uma solução 25 mg/mL preparada em solução salina) foi lentamente injetada bilateralmente durante 4 min nos ventrículos laterais utilizando-se agulhas conectadas por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton de 10 µL. O grupo controle recebeu injeção de solução salina no mesmo volume. As agulhas (uma em cada ventrículo) foram mantidas por mais 1 min e então suavemente removidas. As coordenadas para injeção foram as seguintes: 0,6 mm posterior ao bregma, 1,0 mm lateral à linha média e 3,2 mm ventral a partir da dura-máter (Paxinos e Watson, 1986). A posição correta da agulha foi testada em experimentos anteriores através da injeção de 0,5 µL de solução de azul de metileno (4% em solução salina) e posterior análise histológica.

Os animais que receberam administração icv de LPS ou salina foram sacrificados 24 h após a injeção. O córtex cerebral foi então dissecado, homogeneizado e utilizado nas determinações bioquímicas.

2.3. Preparação dos sinaptossomas

A fração de sinaptossomas representa uma preparação *in vitro* adequada para avaliação de parâmetros de metabolismo energético em células neurais, uma vez que os mesmos funcionam como mini células contendo mitocôndrias. Os sinaptossomas foram obtidos de córtex cerebral de ratos, seguindo a técnica previamente descrita por Springer e colaboradores (1998). Primeiramente, os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia e o córtex cerebral foi dissecado e homogeneizado em 15 mL de solução tampão contendo sacarose 0,32 M, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM e Hepes 20 mM, pH 7,2. O homogeneizado foi centrifugado a 450 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O sedimento restante foi ressuspensionado em 15 mL de tampão e centrifugado conforme descrito anteriormente. As duas frações de sobrenadantes foram combinadas e centrifugadas a 20.000 x g por 10 min a 4°C e a fração bruta contendo sinaptossomas foi ressuspensionada em tampão Locke (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, CaCl₂ 2,3 mM, MgCl₂ 1,0 mM, NaHCO₃ 3,6 mM, glicose 5 mM, Hepes 5 mM, pH 7,2). Após a verificação da integridade das preparações sinaptossomais, medida pela liberação de lactato desidrogenase, foi avaliada a função mitocondrial (redução da resazurina) e a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase nessas amostras.

2.4. Preparação do homogeneizado de córtex cerebral

Para a determinação das atividades de enzimas do CAC, dos complexos da CTE e da CK, o córtex cerebral de ratos administrados ou não com LPS foi homogeneizado (1:20, p/v) em tampão SETH, pH 7,4 (sacarose 250 mM, EDTA 2,0 mM, Trizma Base 10 mM e heparina UI . mL⁻¹). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g durante 10 min e os sobrenadantes armazenados a -70°C até sua utilização para determinação das atividades enzimáticas.

2.5. Determinação da integridade sinaptossomal

A integridade da membrana plasmática sinaptossomal foi analisada pela determinação da atividade da enzima citoplasmática LDH no meio de incubação extracelular. A atividade da enzima foi medida espectrofotometricamente de acordo com o método de Bergmeyer e Brent (1974), seguindo a velocidade de conversão de NADH para NAD⁺ a 340 nm. A liberação de LDH foi expressa como porcentagem de LDH total liberada, comparando com uma amostra com 100% de liberação obtida através da adição de Triton X-100 0,1 % ao meio de incubação.

2.6. Estimativa da função mitocondrial pela redução da resazurina

A determinação da redução da resazurina em preparações sinaptossomais foi realizada de acordo com Springer e colaboradores (1998). A preparação sinaptossomal (50 µg) foi pipetada em placas de 96 poços na presença de 10 µL de resazurina 0,1% e a fluorescência foi medida 60 min após a incubação, utilizando comprimento de onda de excitação de 530 nm e de emissão de 590 nm. Os resultados foram calculados como unidades arbitrárias de fluorescência / mg de proteína e expressos como porcentagem do controle.

2.7. Determinação das atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons (CTE)

As atividades da succinato-2,6-diclorofenolindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) e succinato:citocromo c oxidoreductase (complexo II-III) foram determinadas em homogeneizados de córtex cerebral de acordo com Fischer e colaboradores (1985). A atividade da citocromo c oxidase (complexo IV) foi

determinada de acordo com Rustin e colaboradores (1994). Os métodos utilizados para a avaliação dessas atividades foram modificados de acordo com da Silva e colaboradores (2002). As atividades dos complexos da CTE foram calculadas como nmol / min / mg de proteína.

2.8. Determinação das atividades de enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC)

As atividades das enzimas do CAC foram determinadas em homogeneizados de córtex cerebral de ratos submetidos ou não a administração icv de LPS. A atividade da citrato sintase (CS) foi medida de acordo com Shepherd e Garland (1969) através da redução do DTNB a $\lambda = 412$ nm. A atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH) foi avaliada de acordo com o método de Lai e Cooper (1986) e Tretter e Adam-Vizi (2004), com algumas modificações. A redução do NAD^+ foi realizada em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente. A atividade da succinato desidrogenase (SDH) foi determinada como descrito por Fischer e colaboradores (1985) através da redução do DCIP. As atividades das enzimas do CAC serão calculadas como nmol / min . mg proteína.

2.9. Atividade da Creatina Quinase (CK)

A atividade da CK foi medida em homogeneizado de córtex cerebral de acordo com Hughes (1962) com algumas modificações (Schuck *et al.*, 2002). A mistura reacional foi composta de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl_2 7,5 mM, fosfocreatina 7 mM, lauril maltosídeo 0,625 mM e aproximadamente 0,4-1,2 μg de proteína em um volume final de 100 μL . A reação foi iniciada com a adição de ADP (4

mM) e parada após 10 min com a adição de 0,02 mL de ácido p-hidroximercuribenzóico (50 mM). A creatina formada na reação foi quantificada com um método colorimétrico a partir da adição de 0,1 mL de α -naftol 20 % e 0,1 mL de diacetil 20 % em um volume final de 1 mL, seguida de incubação por 20 min em banho-maria a 37°C. A coloração rósea foi lida espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados foram expressos como μmol de creatina / min . mg de proteína.

2.10. Atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase

A determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em preparações sinaptossomais foi realizada de acordo com Ribeiro e colaboradores (Ribeiro et al., 2011). A mistura reacional continha MgCl_2 5 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM, tampão Tris-HCl 400 mM, pH 7,4, e as preparações sinaptossomais (aproximadamente 5 μg de proteína). O ensaio enzimático foi iniciado pela adição de ATP em uma concentração final de 3 mM. A reação foi parada pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético. A atividade da Mg^{2+} -ATPase (ouabaína-não sensível) foi determinada sob as mesmas condições com a adição de ouabaína 1 mM. A atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). A liberação do fosfato inorgânico foi verificada pelo método de Chan e colaboradores (1986).

2.11. Determinação do conteúdo protéico

O conteúdo protéico das amostras foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

2.12. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média e foram analisados através de teste t de Student para amostras independentes. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 19.

3. Resultados

Inicialmente, avaliamos o efeito da injeção intracerebroventricular de LPS (50 μ g) sobre a integridade sinaptossomal através da medida da liberação de LDH para o meio reacional. Não observamos diferenças significativas na liberação de LDH nos animais injetados com LPS quando comparados ao grupo controle (dados não mostrados).

A função mitocondrial em preparações sinaptossomais foi avaliada através da determinação da redução da resazurina. A figura 1 mostra que a injeção de LPS diminuiu significativamente a fluorescência da resazurina (33%) ($t_{(14)}=3,581$, $p < 0,01$), sugerindo um comprometimento da função mitocondrial em sinaptossomas de ratos que receberam LPS.

As atividades dos complexos da CTE e de algumas enzimas do CAC foram avaliadas em homogeneizados de córtex cerebral 24 h após a injeção icv de LPS ou salina. As atividades dos complexos II, II-III e IV não foram modificadas pela administração de LPS (Figura 2). Por outro lado, nossos resultados demonstram que a atividade da KGDH foi significativamente reduzida (22%) nos animais que receberam

LPS quando comparados com o grupo controle ($t_{(14)}=2,598$, $p < 0,05$), enquanto que as atividades da CS e SDH permaneceram inalteradas (Figura 3).

Avaliamos também a atividade da CK, enzima crucial para a transferência intracelular de fosfatos de alta energia. Observamos que a administração de LPS diminuiu significativamente a atividade da CK (21%) ($t_{(10)}=2,693$, $p < 0,05$) (Figura 4).

Finalmente, investigamos o efeito da injeção icv de LPS sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, enzima fundamental para a manutenção do potencial de membrana necessário para a neurotransmissão normal. A figura 5 demonstra uma redução na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (20%) nos ratos que receberam LPS, quando comparados aos ratos que receberam salina ($t_{(8)}=3,097$, $p < 0,05$).

4. Discussão

A neuroinflamação é um componente comum na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (McGeer et al., 1988; Nguyen et al., 2002), onde as células gliais são ativadas em resposta a situação patológica, produzindo fatores citotóxicos, tais como espécies ativas de oxigênio e nitrogênio e citocinas (Polazzi e Contestabile, 2002). O LPS é um potente agente inflamatório (Quan et al., 1994; Watson et al., 1994) no sistema nervoso central de animais (Haus-Wegrzyniak et al., 1998) e, portanto, a utilização desse composto é um modelo frequentemente aplicado para estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos da neuroinflamação. Recentemente, Tyagi e colaboradores (2008) verificaram que a administração de LPS em ratos estimula a produção de citocinas (TNF e IL-6) em córtex cerebral, além de induzir dano oxidativo lipídico. Apesar de esses achados indicarem o envolvimento de estresse oxidativo na neuroinflamação, pouco se sabe sobre a participação de uma possível disfunção energética nesse processo.

Assim, no presente estudo avaliamos os efeitos da injeção icv de LPS sobre parâmetros da bioenergética em córtex cerebral de ratos. Inicialmente observamos que a administração de LPS causou uma diminuição significativa na redução da resazurina em sinaptossomas de córtex cerebral. A resazurina é um corante fluorescente que atua como acceptor de elétrons provenientes do complexo IV da CTE, sendo considerada um indicador sensível da função mitocondrial (Gonzalez e Tarloff, 2001; Nakai et al., 2003; Springer et al., 1998). Dessa forma, nossos resultados indicam que a neuroinflamação induzida por LPS compromete a bioenergética mitocondrial em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Essa conclusão é reforçada por estudos prévios demonstrando que o tratamento de sinaptossomas com os inibidores metabólicos MPP⁺, cianeto, malonato e antimicina também diminui a fluorescência da resazurina, causando alterações na homeostasia energética devido à disfunção mitocondrial (Nakai et al., 2003; Springer et al., 1998).

Essas alterações na função mitocondrial podem ocorrer devido à redução nas atividades de enzimas do CAC, da via glicolítica ou dos complexos da CTE. Portanto, investigamos os efeitos da administração de LPS sobre as atividades dessas enzimas. Nossos resultados demonstram que não houve alterações significativas nas atividades dos complexos II, II-III e IV da CTE no córtex cerebral dos animais que receberam LPS, sugerindo que a redução na função mitocondrial não parece ser devido a alterações nas atividades desses complexos. Por outro lado, Chuang e colaboradores (2002) demonstraram que a injeção intravenosa de LPS reduz a atividade dos complexos I e IV da cadeia de transporte de elétrons na medula rostral ventrolateral em ratos. Além disso, a injeção intraestriatal de LPS induz parkinsonismo associado à perda de neurônios dopaminérgicos e redução da respiração mitocondrial no estriado (Choi et al., 2009; Hunter et al., 2007). Essas diferenças com relação aos nossos resultados podem ser

explicadas, ao menos em parte, pela região cerebral avaliada, bem como pela via de administração do LPS, visto que determinamos os efeitos de uma injeção icv de LPS em córtex cerebral de ratos, ao passo que os outros estudos utilizaram administrações sistêmica e intraestriatal para avaliar os efeitos do LPS em medula rostral ventrolateral e estriado de ratos, respectivamente.

Verificamos também que as atividades das enzimas do CAC CS e SDH não foram modificadas neste modelo. No entanto, a administração de LPS diminuiu a atividade do complexo KGDH. A KGDH é uma enzima chave do CAC (Ambrus et al., 2009), catalisando a conversão de α -cetoglutarato em succinil-CoA associada à redução do NAD^+ em NADH que será utilizado na CTE. Portanto, é possível que a redução da função mitocondrial seja causada pela diminuição da disponibilidade de NADH causada pela redução na atividade da KGDH. Neste contexto, Tretter e Adam-Vizi (2000) demonstraram um decréscimo na geração de NADH causada pela inibição dessa atividade enzimática por peróxido de hidrogênio. Além disso, inibições desta atividade enzimática estão associadas com dano oxidativo encontrado em envelhecimento, isquemia/reperfusão, câncer e doenças neurodegenerativas (Gibson et al., 2000; Lucas e Szweda, 1999; Shi et al., 2008; Tretter e Adam-Vizi, 2005). No entanto, não podemos descartar possíveis alterações nas atividades de outras enzimas do CAC, da CTE e da via glicolítica que não foram avaliadas no presente estudo, como co-responsáveis pela disfunção mitocondrial induzida pelo LPS e medida através da redução da resazurina.

A atividade da CK também foi diminuída pela injeção de LPS. Esta atividade enzimática é crucial para o funcionamento celular normal do cérebro e foi reconhecido como importante regulador metabólico em situações fisiológicas e/ou patológicas (Gross et al., 1996; Hamman et al., 1995; Holtzman et al., 1997; Wallimann et al., 1998; Wyss et al., 1992). Nesse contexto, já foi evidenciada uma inibição na atividade da CK

após a exposição a agentes geradores de espécies reativas devido à oxidação de resíduos essenciais de cisteína na estrutura da enzima (Arstall et al., 1998; Burmistrov et al., 1992; Konorev et al., 1998; Stachowiak et al., 1998; Wallimann et al., 1998; Wolosker et al., 1996). Além disso, Tyagi e colaboradores (2008) demonstraram que a injeção icv de LPS induz oxidação lipídica e diminui os níveis de GSH em cérebro de ratos, o que sugere que a inibição da CK causada por LPS é mediada pela geração de espécies reativas.

Finalmente, observamos que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, estava reduzida em preparações sinaptossomais de ratos injetados com LPS, sugerindo que o potencial de membrana necessário para a excitabilidade neuronal e controle do volume celular está alterado (Erecinska et al., 2004; Erecinska e Silver, 1994; Wheeler et al., 1975). Considerando a Na^+, K^+ -ATPase, similarmente à CK, é sensível ao ataque de espécies reativas (Jamme et al., 1995; Kurella et al., 1997; Lees, 1993; Rauchova et al., 1999; Yousef et al., 2002), e que foram demonstradas reduções nesta atividade enzimática devido a modificações oxidativas em fosfolipídeos de membrana onde esta enzima está inserida (Fleuranceau-Morel et al., 1999; Lehotsky et al., 1999; Yufu et al., 1993), é possível que a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase observada no presente trabalho seja causada pela produção de espécies reativas e/ou peroxidação lipídica.

Em conclusão, nossos achados demonstram o envolvimento de disfunção bioenergética na neuroinflamação, já que a injeção de LPS causou prejuízo na função mitocondrial e reduziu as atividades de importantes enzimas essenciais para a homeostase energética em córtex cerebral de ratos jovens. Além disso, considerando que a neuroinflamação é um importante mecanismo envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, este modelo animal de neuroinflamação associado

a um prejuízo na produção de energia pode ser uma ferramenta útil no entendimento e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essas doenças.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq, PRONEX II, FINEP, Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EM, Programa Nacional de Pós-Doutorado – PNPd/CAPES.

Referências

Ambrus, A., Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2009) Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *Journal of Neurochemistry* 109 Suppl 1, 222-229.

Arstall, M.A., Bailey, C., Gross, W.L., Bak, M., Balligand, J.L., Kelly, R.A. (1998) Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30, 979-988.

Bergmeyer, H.U., Brent, E. (1974) UV-assay with pyruvate and NADH, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp. 574 –579.

Blass, J.P. (2001) Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *Journal of Neuroscience Research* 66, 851-856.

Brennan, W.A., Jr., Bird, E.D., Aprille, J.R. (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *Journal of Neurochemistry* 44, 1948-1950.

Burmistrov, S.O., Mashek, O.P., Kotin, A.M. (1992) [The action of acute alcoholic intoxication on the antioxidant system and creatine kinase activity in the brain of rat embryos]. *Eksp Klin Farmakol* 55, 54-56.

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.

Chinta, S.J., Andersen, J.K. (2006) Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 41, 1442-1448.

Choi, D.Y., Liu, M., Hunter, R.L., Cass, W.A., Pandya, J.D., Sullivan, P.G., Shin, E.J., Kim, H.C., Gash, D.M., Bing, G. (2009) Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS ONE* 4, e5482.

Chuang, Y.C., Tsai, J.L., Chang, A.Y., Chan, J.Y., Liou, C.W., Chan, S.H. (2002) Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Journal of Biomedical Science* 9, 542-548.

Cohen, J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891.

Correale, J., Villa, A. (2004) The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *Journal of Neurology*. 251, 1304-1316.

da Silva, C.G., Ribeiro, C.A.J., Leipnitz, G., Dutra, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Sarkis, J.J.F., Jakobs, C., Wajner, M. (2002) Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1586, 81-91.

Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A. (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. *Progress in Neurobiology* 73, 397-445.

- Erecinska, M., Silver, I.A. (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 43, 37-71.
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* 28, 138-145.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M.F., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M. (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta* 153, 23-36.
- Fleurbaey-Morel, P., Barrier, L., Fauconneau, B., Piriou, A., Huguet, F. (1999) Origin of 4-hydroxynonenal incubation-induced inhibition of dopamine transporter and Na⁺/K⁺ adenosine triphosphate in rat striatal synaptosomes. *Neuroscience Letters* 277, 91-94.
- Gibson, G.E., Park, L.C., Sheu, K.F., Blass, J.P., Calingasan, N.Y. (2000) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochemistry International* 36, 97-112.
- Gonzalez, R.J., Tarloff, J.B. (2001) Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology In Vitro* 15, 257-259.
- Gross, W.L., Bak, M.I., Ingwall, J.S., Arstall, M.A., Smith, T.W., Balligand, J.L., Kelly, R.A. (1996) Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5604-5609.
- Hagberg, H., Mallard, C. (2005) Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. *Current Opinion in Neurology* 18, 117-123.

Hamman, B.L., Bittl, J.A., Jacobus, W.E., Allen, P.D., Spencer, R.S., Tian, R., Ingwall, J.S. (1995) Inhibition of the creatine kinase reaction decreases the contractile reserve of isolated rat hearts. *American Journal of Physiology* 269, H1030-1036.

Hauss-Wegrzyniak, 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.

Heales, S.J., Bolanos, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B. (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1410, 215-228.

Holtzman, D., Meyers, R., Khait, I., Jensen, F. (1997) Brain creatine kinase reaction rates and reactant concentrations during seizures in developing rats. *Epilepsy Research* 27, 7-11.

Hughes, B.P. (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clinica Chimica Acta* 7, 597-&.

Hunter, R.L., Dragicevic, N., Seifert, K., Choi, D.Y., Liu, M., Kim, H.C., Cass, W.A., Sullivan, P.G., Bing, G. (2007) Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *Journal of Neurochemistry* 100, 1375-1386.

Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7, 333-337.

Kerschensteiner, M., Meinel, E., Hohlfeld, R. (2009) Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 158, 1122-1132.

- Konorev, E.A., Hogg, N., Kalyanaraman, B. (1998) Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* 427, 171-174.
- Kurella, E., Kukley, M., Tyulina, O., Dobrota, D., Matejovicova, M., Mezesova, V., Boldyrev, A. (1997) Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. *Annals of New York Academy of Sciences* 834, 661-665.
- Lai, J.C., Cooper, A.J. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *Journal of Neurochemistry* 47, 1376-1386.
- Lees, G.J. (1993) Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54, 287-322.
- Lehotsky, J., Kaplan, P., Racay, P., Matejovicova, M., Drgova, A., Mezesova, V. (1999) Membrane ion transport systems during oxidative stress in rodent brain: protective effect of stobadine and other antioxidants. *Life Sciences* 65, 1951-1958.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lucas, D.T., Szweda, L.I. (1999) Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6689-6693.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- Merrill, J.E. (1992) Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Developmental Neuroscience* 14, 1-10.

Nagatsu, T., Sawada, M.(2006) Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Molecular Neurobiology*.26(4-6), 781-802.

Nakai, M., Mori, A., Watanabe, A., Mitsumoto, Y. (2003) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) decreases mitochondrial oxidation-reduction (REDOX) activity and membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in rat striatum. *Experimental Neurology* 179, 103-110.

Nguyen, M.D., Julien, J.P., Rivest, S. (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature Reviews. Neuroscience* 3, 216-227.

Onyango, I.G., Khan, S.M. (2006) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and stress signaling in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 3, 339-349.

Paxinos, G., Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego.

Polazzi, E., Contestabile, A. (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Reviews in the Neurosciences* 13, 221-242.

Quan, N., Sundar, S.K., Weiss, J.M. (1994) Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology* 49, 125-134.

Rauchova, H., Drahota, Z., Koudelova, J. (1999) The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na^+/K^+ -ATPase activity. *Physiological Research* 48, 73-78.

Ribeiro, C.A., Hickmann, F.H., Wajner, M. (2011) Neurochemical evidence that 3-methylglutaric acid inhibits synaptic Na^+,K^+ -ATPase activity probably through oxidative damage in brain cortex of young rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29, 1-7.

Rothwell, N.J., Strijbos, P.J. (1995) Cytokines in neurodegeneration and repair. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13, 179-185.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta* 228, 35-51.

Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. (2002) Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochemical Research* 27, 1633-1639.

Schurr, A. (2002) Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochemistry International* 41, 1-8.

Shepherd, D., Garland, P.B. (1969) Citrate synthase from rat liver. *Methods in Enzymology* 13, 11-13.

Shi, Q., Xu, H., Kleinman, W.A., Gibson, G.E. (2008) Novel functions of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1782, 229-238.

Springer, J.E., Azbill, R.D., Carlson, S.L. (1998) A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. *Brain Research. Brain Research Protocols* 2, 259-263.

Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., Richter, C. (1998) Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem* 273, 16694-16699.

Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., Yoshida, T. (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory

deficits without neuronal cell death in rats. *Journal of Neuroscience Research* 83, 557-566.

Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *Journal of Neuroscience* 20, 8972-8979.

Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Journal of Neuroscience* 24, 7771-7778.

Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360, 2335-2345.

Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C., Shukla, R. (2008) Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. *Journal of Neuroimmunology* 205, 51-56.

Wallimann, T., Dolder, M., Schlattner, U., Eder, M., Hornemann, T., O'Gorman, E., Ruck, A., Brdiczka, D. (1998) Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 8, 229-234.

Watson, R.W., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D. (1994) Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 95-103.

Wheeler, K.P., Walker, J.A., Barker, D.M. (1975) Lipid requirement of membrane Na⁺,K⁺-dependent adenosine triphosphate system. *Biochemical Journal* 146, 713-722.

Wolosker, H., Panizzutti, R., Engelender, S. (1996) Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett* 392, 274-276.

Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A., Wallimann, T. (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1102, 119-166.

Yousef, M.I., El-Hendy, H.A., El-Demerdash, F.M., Elagamy, E.I. (2002) Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology* 175, 223-234.

Yufu, K., Itoh, T., Edamatsu, R., Mori, A., Hirakawa, M. (1993) Effect of hyperbaric oxygenation on the Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase and membrane fluidity of cerebrocortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochemical Research* 18, 1033-1039.

Zipp, F., Aktas, O. (2006) The brain as atarget of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neuroscience* 29, 518-527.

Legendas das Figuras

Figure 1: Avaliação da função mitocondrial através da redução da resazurina em preparações sinaptossomais de córtex cerebral de ratos 24 h após a injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg). Preparações sinaptossomais obtidas de animais injetados com LPS ou salina (grupo controle) foram incubadas a 37°C durante 60 min na presença de resazurina e a fluorescência foi então determinada. Os dados são apresentados como média ± EPM para 8 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como unidades arbitrárias de fluorescência. ** $p < 0,01$, comparado ao grupo Salina (teste *t* de Student para amostras independentes).

Figura 2. Avaliação das atividades dos complexos II, II-III e IV da cadeia de transporte de elétrons (CTE) em córtex cerebral de ratos 24 h após a injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg). Os dados são apresentados como média ± EPM para 5-7 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como nmol/min/mg proteína. Não foram observadas diferenças significativas (teste *t* de Student para amostras independentes).

Figura 3. Avaliação das atividades das enzimas citrato sintase (CS), α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH) e succinato desidrogenase (SDH) em córtex cerebral de ratos 24 h após a injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg). Os dados são apresentados como média ± EPM para 6-8 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como nmol/min/mg proteína. * $p < 0,05$, comparado ao grupo Salina (teste *t* de Student para amostras independentes).

Figura 4. Avaliação da atividade da creatina quinase (CK) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos 24 h após a injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg). Os dados são apresentados como média ± EPM para 6 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como µmol/min/mg proteína. *p < 0,05, comparado ao grupo Salina (teste *t* de Student para amostras independentes).

Figura 5. Avaliação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos 24 h após a injeção intracerebroventricular (icv) de lipopolissacarídeo (LPS, 50 µg). Os dados são apresentados como média ± EPM para 5 experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como µmol/min/mg proteína. *p < 0,05, comparado ao grupo Salina (teste *t* de Student para amostras independentes).

Figura 1

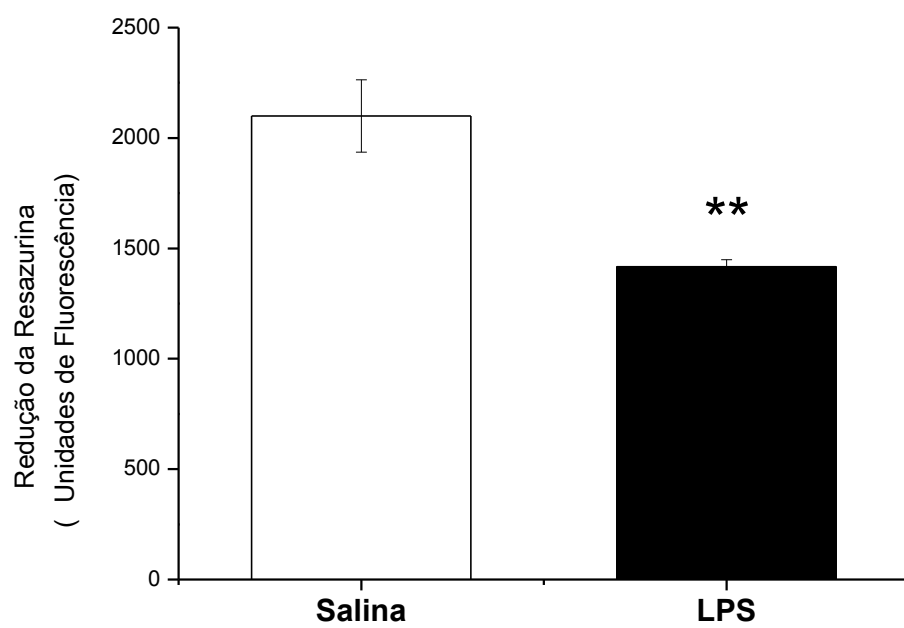


Figura 2

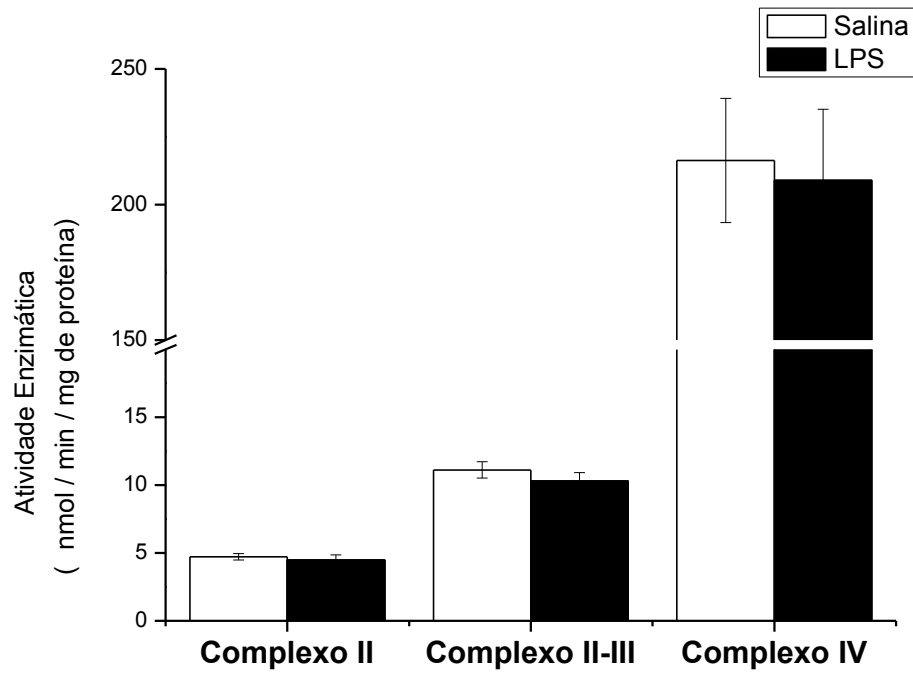


Figura 3

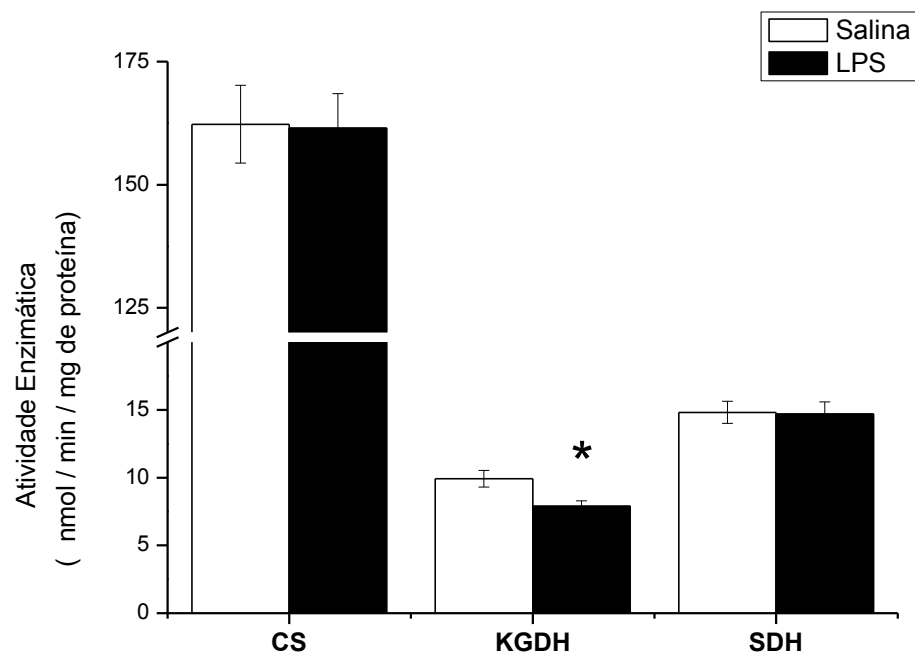


Figura 4

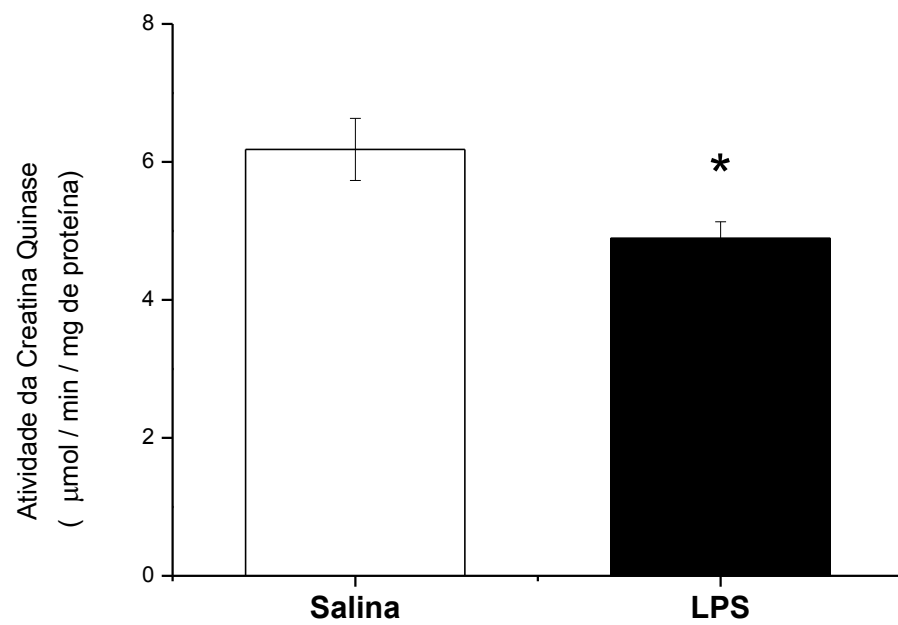


Figura 5

