



**Liliana Patrícia Alves Efeito do colesterol na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase
Oliveira**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2012

**Liliana Patrícia Alves
Oliveira**

Efeito do colesterol na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira

Professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João Miguel Silva Cordeiro (arguente)

Investigador auxiliar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Professora Doutora Virgília Sofia Silva (orientadora)

Investigadora de Pós-doutoramento, CESAM, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva, pelo apoio constante, disponibilidade e orientação científica, bem como a amizade e incentivo que sempre me transmitiu.

Gostaria também de expressar um especial agradecimento à Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves pela disponibilização do seu laboratório que permitiu a realização deste trabalho.

À minha colega de laboratório Ana Calejo um muito obrigada pelos momentos de trabalho e amizade que partilhámos.

Às minhas colegas de Mestrado e em especial à minha amiga Rita que esteve sempre presente, que me apoiou e incentivou a continuar.

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu irmão, pela paciência, incentivo, carinho e por acreditarem em mim.

Por fim ao Roberto, o meu namorado, pela dedicação e ajuda neste projeto, pelo apoio incondicional e pelo carinho.

palavras-chave

Alumínio, (Na⁺/K⁺)ATPase, colesterol, neurotoxicidade, sinaptossomas, metil-β-ciclodextrina

resumo

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre sendo a sua exposição cada vez maior nas sociedades industrializadas. Numa sociedade cada vez mais envelhecida onde o número de casos de doenças neurodegenerativas tendem a aumentar, parece importante esclarecer os mecanismos celulares da neurotoxicidade do alumínio de forma a prevenir os seus efeitos. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a exposição a alumínio inibe a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase, proteína responsável pela manutenção e regulação dos gradientes eletroquímicos das membranas plasmáticas, e que a suscetibilidade à intoxicação por alumínio na dieta pode ser condicionada pelo colesterol, uma vez que, a exposição oral crónica a alumínio reduz a razão molar colesterol/fosfolípidos em sinaptossomas. Assim este trabalho, tem como objetivo esclarecer de que forma os diferentes níveis de colesterol afetam a inibição da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal induzida pelo alumínio. Neste contexto foram utilizados como grupos de estudo, o controlo, em que não houve manipulação do teor de colesterol na membrana sinaptossomal; a incorporação, onde o teor de colesterol da membrana sinaptossomal foi aumentado; a depleção, em que o teor de colesterol da membrana sinaptossomal foi reduzido. As alterações do teor de colesterol da membrana dos sinaptossomas foram provocadas usando o composto metil-β-ciclodextrina e a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal medida por colorimetria e por potenciometria. Neste trabalho, houve um aumento de 70% de colesterol sinaptossomal em relação ao controlo, e uma redução do teor de colesterol sinaptossomal em relação ao mesmo de 62%. A exposição *in vitro* dos sinaptossomas a AlCl₃ 300 μM inibiu a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase nos três grupos (controlo, incorporação e depleção). Nos sinaptossomas controlo onde o teor de colesterol foi de 183 ± 48 μg de colesterol/mg de proteína, a exposição *in vitro* a AlCl₃ 300 μM levou a uma inibição da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase de 76,39%, enquanto que, na presença de 279 ± 54 μg de colesterol/mg de proteína (incorporação de colesterol) o alumínio teve um efeito inibitório na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase de 72,88%. Por outro lado, para baixos níveis de colesterol (57 ± 16 μg de colesterol/mg de proteína) o alumínio teve um efeito inibitório na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase de 37,82%. Estes resultados, mostram que alterações do teor de colesterol nas membranas de sinaptossomas desempenham um importante papel na ação do alumínio sobre a (Na⁺/K⁺)ATPase. Assim, parece que baixos níveis de colesterol membranar atenuam o efeito inibitório do alumínio sobre a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase.

keywords

Aluminium, (Na⁺/K⁺)ATPase, cholesterol, neurotoxicity, synaptosomes, methyl-β-cyclodextrin

abstract

Aluminium is the most abundant metal in the earth's crust and its exposure increasing in industrialized societies. In an increasingly aging society where the number of cases of neurodegenerative diseases is increasing, it seems important to clarify the cellular mechanisms of the neurotoxicity of aluminium to prevent its effects. *In vivo* and *in vitro* studies indicate that exposure to aluminium inhibits the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase, a protein responsible for the maintenance and regulation of the electrochemical gradients of the plasma membranes, and that susceptibility to intoxication by aluminium in the diet may be influenced by cholesterol, since chronic oral exposure to aluminium reduces the molar ratio of cholesterol/phospholipid in synaptosomes. Thus this work aims to clarify how the different levels of cholesterol affects the inhibition of synaptosomal (Na⁺/K⁺)ATPase induced by aluminium. In this context were used as the study groups, the control in which no manipulation of the content of cholesterol in synaptosomal membrane was made; incorporation, where the cholesterol content was increased synaptosomal membrane; depletion, wherein the cholesterol content of the membrane synaptosomal was reduced. The changes in membrane cholesterol content of synaptosomes were induced using the compound methyl-β-cyclodextrin and the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase synaptosomal measured by colorimetry and potentiometry. In this study, there was a ~70% increase synaptosomal cholesterol relative to control, and reduced cholesterol content compared to the same synaptosomal ~62%. The *in vitro* exposure of synaptosomes to 300 μM AlCl₃ inhibited the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase in the three groups (control, incorporation and depletion). In control synaptosomes which the cholesterol content was 183 ± 48 μg cholesterol/mg protein, *in vitro* exposure to 300 μM AlCl₃ led to an inhibition of the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase of 76.39%, while in the presence of 279 ± 54 μg cholesterol/mg protein (incorporation of cholesterol) aluminium had an inhibitory effect on the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase of 72.88%. Conversely, lowest cholesterol levels (57 ± 16 μg cholesterol/mg protein) aluminium had an inhibitory effect on the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase of 37.82%. These results show that changes in cholesterol content of synaptosome membranes play an important role in the action of aluminium on the (Na⁺/K⁺)ATPase. Thus, it appears that low levels of membrane cholesterol attenuate the inhibitory effect of aluminium on the activity of (Na⁺/K⁺)ATPase.

Índice

Abreviaturas.....	1
Lista de Figuras.....	3
1. Introdução.....	5
1.1. Alumínio - Um agente neurotóxico	7
1.2. A (Na ⁺ /K ⁺)ATPase nas células nervosas	9
1.3. O alumínio inibe a atividade da (Na ⁺ /K ⁺)ATPase	14
1.4. A importância do colesterol no cérebro	17
1.5. Objetivo.....	19
2. Material e Métodos	21
2.1. Isolamento de sinaptossomas a partir de córtex cerebral de ratos	23
2.2. Quantificação de proteína.....	24
2.3. Depleção de colesterol.....	25
2.4. Incorporação de colesterol	26
2.5. Quantificação de colesterol	26
2.6. Medição da atividade da adenosinatrifosfatase	27
2.7. Análise estatística dos dados	31
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Alteração dos níveis de colesterol da membrana dos sinaptossomas	37
3.2. Determinação da atividade da (Na ⁺ /K ⁺)ATPase sinaptossomal no grupo controlo.....	40
3.3. Efeito do colesterol na ação do alumínio sobre a atividade da (Na ⁺ /K ⁺)ATPase.....	43
4. Conclusão.....	51
5. Bibliografia	55

Abreviaturas

ADP	adenosina-5'-difosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ATPase	adenosinatrifosfatase
CH	colesterol
EDTA	ácido [etilenodiamino]tetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis[β -mino-(éter etílico)]-N,N'-tetracético
<i>g</i>	aceleração da gravidade
HEPES	ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanossulfónico]
Pi	fosfato inorgânico
PL	fosfolípidos
M β CD	metil- β -ciclodextrina
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da topologia das subunidades α , β e γ da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (adaptado de Blanco (2003/04)).....	11
Figura 2: Ciclo Funcional da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (adaptado de Yatime, <i>et al</i> 2011).	12
Figura 3: Isolamento de sinaptossomas (adaptado do método de Hájos, 1975).	24
Figura 4: Registo da potenciometria no controlo na ausência (A) e na presença de ubaína (B).	31
Figura 5: Efeito da exposição <i>in vitro</i> a alumínio na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal (adaptado de Silva & Gonçalves, 2003).....	36
Figura 6: Concentração de colesterol na membrana de sinaptossomas de córtex cerebral de rato.....	38
Figura 7: Efeito das diferentes concentrações de M β CD nos níveis de colesterol das membranas de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato.	39
Figura 8: Determinação da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal no grupo controlo na ausência de alumínio por colorimetria.....	41
Figura 9: Determinação da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal no grupo controlo na ausência de alumínio por potenciometria.	42
Figura 10: Efeito da exposição <i>in vitro</i> a alumínio e dos diferentes níveis de colesterol na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$	45
Figura 11: Percentagem de inibição da atividade $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal na exposição <i>in vitro</i> a alumínio.	49
Figura 12: Efeito da exposição <i>in vitro</i> a alumínio e dos diferentes níveis de colesterol na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$	46

1. Introdução

1.1. Alumínio - Um agente neurotóxico

O alumínio é o terceiro elemento na natureza e o metal mais abundante na crosta terrestre, sendo um metal não essencial para os mamíferos (Albendea, *et al.*, 2007; Bhadauria, 2012).

Devido às suas características, simultaneamente maleável e dúctil, para além da resistência à corrosão, o alumínio possui outras propriedades, tais como alta condutividade elétrica e térmica e baixa densidade. Por estes motivos e pelo seu baixo custo, este metal tem inúmeras aplicações industriais (Albendea, *et al.*, 2007).

A exposição humana ao alumínio pode ocorrer por via oral, nasal, intravenosa e cutânea, sendo a via oral a principal via de exposição a alumínio. Os aditivos alimentares são geralmente a maior fonte de alumínio na dieta, contudo este metal é também usado como constituinte de utensílios de cozinha e embalagens alimentares, contribuindo para o aumento de alumínio ingerido. A indústria farmacêutica também utiliza os sais de alumínio, em medicamentos como antiácidos e antitranspirantes. Na água, os sais de alumínio são frequentemente usados para remover a cor e a turvação, durante os processos de tratamento e purificação de água potável. Portanto, o abastecimento urbano de água contém uma maior concentração de iões de alumínio, aumentando assim a exposição Humana a este metal (Kaizer, *et al.*, 2007; Sethi, *et al.*, 2008; Bondy, 2012).

Um número crescente de estudos epidemiológicos, relacionam o teor de alumínio na água potável, com aumento da incidência de doenças neurológicas. (Sethi, *et al.*, 2008).

O aumento da prevalência da chuva ácida pode conduzir à libertação de maiores quantidades de sais de alumínio a partir de minerais insolúveis, levando a uma maior biodisponibilidade do alumínio (Polizzi, *et al.*, 2002).

As primeiras preocupações com a utilização do alumínio surgiram em 1897, quando Doelken injetou tartarato de alumínio em coelhos e observou degenerescência neuronal em determinadas zonas cerebrais (Doelken, 1897). Em 1921, Seibert e Wells

observaram alterações no sistema nervoso central após administração sistêmica do alumínio, admitindo-se desde então o seu presumível papel neurotóxico (Kerr & Ward, 1988). No entanto, mais de um século após as primeiras evidências de neurotoxicidade do alumínio, ainda muito pouco se sabe acerca do seu mecanismo de ação neurotóxica e das concentrações a partir das quais a referida ação neurotóxica se desencadeia. A título indicativo, foi sugerido que o conteúdo em alumínio do cérebro humano é 15 - 30 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso seco, e que em casos de intoxicação por alumínio estes níveis podem aumentar 3 a 10 vezes (Ganrot, 1986).

O alumínio é aceito como sendo um agente neurotóxico (Bolla, *et al.*, 1992; Yokel, 2000), implicado na etiopatogênese de doenças neurodegenerativas tais como a Doença de Alzheimer (Crapper, *et al.*, 1973).

Níveis elevados de alumínio têm sido observados no cérebro, onde existem formações de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, que são as principais características histopatológicas da Doença de Alzheimer, que juntamente com outros mecanismos levam à perda de neurónios (Beauchemin, *et al.*, 1998). Emaranhados neurofibrilares são agregações da proteína tau microtubular dentro do citoplasma dos neurónios, que está hiperfosforilada, sendo as placas senis depósitos extracelulares resultantes da acumulação de várias proteínas, uma delas é a proteína β -amilóide. Vários estudos têm demonstrado que o alumínio promove a formação e acumulação da proteína β -amilóide e a agregação da proteína tau hiperfosforilada. O seu efeito neurotóxico está associado também ao déficit da neurotransmissão colinérgica e à indução de stress oxidativo no cérebro (Yokel, 2000; Exley, *et al.*, 2001; Exley, *et al.*, 2004).

Uma vez que o papel do alumínio na patogênese da Doença de Alzheimer não é claro, a pesquisa sobre os mecanismos celulares da neurotoxicidade do alumínio é extremamente importante para elucidar o risco da exposição alumínio (Silva, *et al.*, 2002).

No sistema nervoso o alumínio está associado a alterações morfológicas e bioquímicas que tendem a reduzir a transmissão sináptica, promovendo a neurotoxicidade (Yokel, 2000; Yokel *et al.*, 2001).

Um dos mecanismos de destruição neuronal e degenerativa é a apoptose (processo de morte celular regulado). O aumento dos níveis de alumínio no cérebro ocorre com o envelhecimento. Este perturba as cascatas de sinalização de certas células e induz a apoptose dos neurónios pelo seu efeito sobre o funcionamento do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. O sistema nervoso é altamente sensível aos danos oxidativos resultantes da ação de radicais livres. A importância fisiológica das alterações não controladas devido aos radicais livres nas propriedades físicas das membranas reside na sua relação com numerosas funções celulares. Assim, níveis inadequados de fluidez lipídica das membranas e a exposição ao alumínio têm sido implicados no envelhecimento e em processos de doenças neurodegenerativas (Mason, *et al.*, 2003; Albendea, *et al.*, 2007; Sethi, *et al.*, 2008, Exley, *et al.*, 2009).

O aumento da esperança média de vida da população leva a um aumento de casos de doenças neurodegenerativas crónicas, como é o caso da Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (Sjögren, *et al.*, 2006).

O alumínio parece promover eventos tipicamente associados com o envelhecimento do cérebro (Bondy, 2010; Bhadauria, 2012).

1.2. A (Na⁺/K⁺)ATPase nas células nervosas

Em 1957, Jens Cristian Skou descobriu a (Na⁺/K⁺)ATPase e propôs o seu papel na extrusão ativa do Na⁺ da célula nervosa (Skou, 1957).

Nas décadas seguintes, foi realizado um trabalho extenso sobre a estrutura e função da (Na⁺/K⁺)ATPase.

A (Na⁺/K⁺)ATPase é a maior proteína do complexo na família das ATPases do tipo P, ocorrendo, durante o ciclo de transporte de iões acoplado à hidrólise de ATP, a sua modificação covalente por fosforilação (Kaplan, 2002; Geering, 2006).

A (Na⁺/K⁺)ATPase também é conhecida como a bomba sódio e potássio e é responsável pela manutenção dos gradientes de Na⁺ e K⁺ através da membrana

plasmática de todas as células eucarióticas (Skou, 1965; Horisberger, 2004). Assim, esta enzima hidrolisa o ATP em ADP e Pi, enquanto bombeia Na⁺ para o exterior e K⁺ para o interior da célula contra os respetivos gradientes eletroquímicos, de acordo com a seguinte equação:



A (Na⁺/K⁺)ATPase, é essencial para a geração e manutenção dos gradientes de Na⁺ e K⁺ entre o meio intra e extracelular, um pré-requisito básico para a homeostase celular e para as funções especializadas dos tecidos. Os gradientes eletroquímicos de Na⁺ e K⁺ são importantes para o controlo do volume celular, transporte de metabolitos e outras substâncias, bem como para assegurar a excitabilidade das células nervosas (Chakraborty, *et al.*, 2003; Liu, *et al.*, 2003; Trevisi, *et al.*, 2006; Quintas, *et al.*, 2010).

A (Na⁺/K⁺)ATPase está presente em grandes quantidades nos neurónios e nas células gliais e é responsável pelo consumo de 40-50% do ATP formado no cérebro. A sua atividade está relacionada com a fluidez da membrana (Chakraborty, *et al.*, 2003; Liu, *et al.*, 2003; Silva & Gonçalves, 2003).

A estrutura da enzima consiste em duas subunidades de proteínas α e β ligadas não covalentemente. Além dessas duas subunidades pode existir uma pequena subunidade γ , pertencente à família FXYD (Figura 1) (Kühlbrandt, 2004).

A subunidade catalítica α é um polipeptídeo grande com uma sequência de aminoácidos conhecida (1020 resíduos) e tem um peso molecular de aproximadamente 100 kDa. É uma proteína integral com 10 domínios transmembranares e contém os sítios de ligação para Na⁺ e K⁺, Mg²⁺, ATP e para um inibidor específico, a ubaína (Kühlbrandt, 2004; Toyoshima, *et al.*, 2011). Esta subunidade contém ainda os domínios citoplasmáticos N (de ligação do nucleótido), P (de fosforilação) e A (de atuador) (Jorgensen, *et al.*, 2003; Kühlbrandt, 2004).

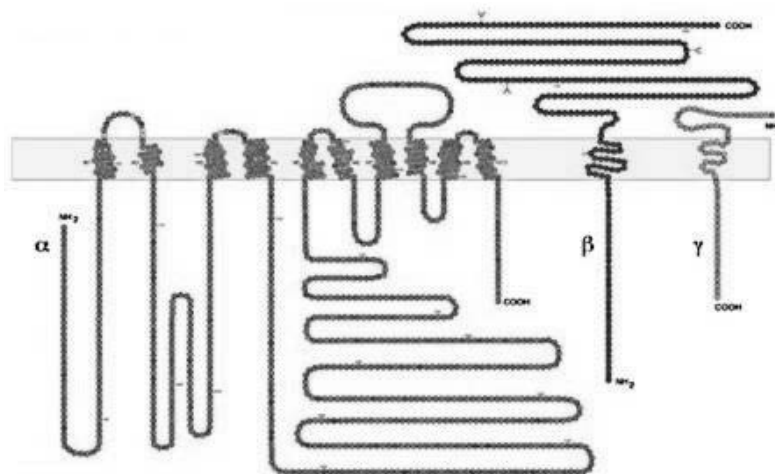


Figura 1: Esquema da topologia das subunidades α , β e γ da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (adaptado de Blanco (2003/04)).

A subunidade β , é uma glicoproteína com um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. É uma proteína integral que possui um único segmento transmembranar. A subunidade β é importante na biogênese da enzima, parecendo desempenhar um papel na formação e maturação da holoenzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, na regulação da estabilidade conformacional e na atividade da subunidade α . Além disso, ela pode estar envolvida na modulação da afinidade da enzima para o Na^+ e K^+ (Yu, 2003; Toyoshima, *et al.*, 2011).

Vários mecanismos podem regular a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, influenciando os papéis funcionais da enzima em diferentes condições, tornando a proteína vulnerável a eventos patológicos. Esses mecanismos reguladores também tornam a enzima um potencial alvo para tratamentos terapêuticos (Frank *et al.*, 2008). Além da sua dependência de ATP, a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é regulada pelo estado de fosforilação, por substâncias endógenas como a ubaína e por neurotransmissores (Yu, 2003).

O heterodímero de subunidades proteicas α e β , ligadas não covalentemente, constitui a unidade funcional mínima capaz de hidrolisar ATP e sustentar a transição entre

os estados conformacionais E_1 e E_2 que ocorrem durante o ciclo catalítico (Kühlbrandt, 2004).

Segundo o mecanismo de reação de Albert-Post para a hidrólise de ATP, a $(Na^+/K^+)ATPase$ possui dois estados conformacionais E_1 e E_2 durante cada ciclo catalítico. No primeiro passo da sequência de reação, quando o Na^+ se liga aos locais expostos à face extracelular, a enzima hidrolisa ATP com elevada afinidade, ocorrendo fosforilação num resíduo de aspartato, situado no domínio intracelular central, e consequente formação de $(Na_3)E_1P$ (Kaplan, 2002; Toyoshima, *et al.*, 2011).

A enzima no estado E_1 tem alta afinidade para Na^+ e ATP, porém baixa afinidade para K^+ . Este estado intermediário muda para E_2 , formando E_2P . No estado E_2 a enzima tem alta afinidade para K^+ , mas baixa afinidade para Na^+ e ATP. Desta forma, as mudanças conformacionais permitem que os íons Na^+ passem para o meio externo e íons K^+ se liguem à enzima e passem para o interior da célula (Figura 2 ilustra o ciclo de reação da enzima) (Kaplan, 2002; Toyoshima, *et al.*, 2011).

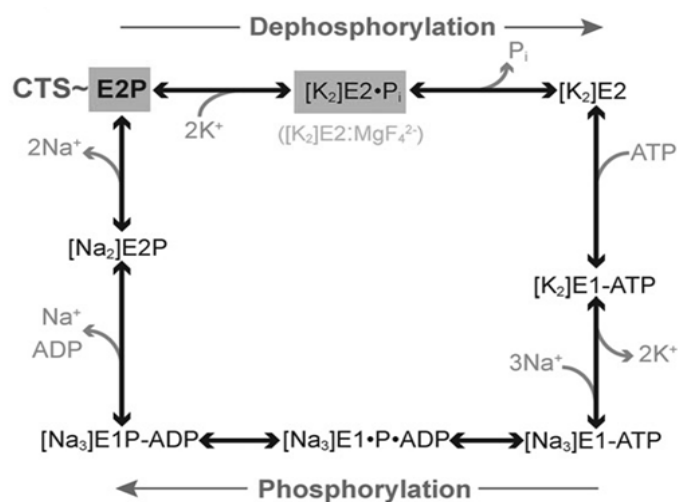


Figura 2: Ciclo Funcional da $(Na^+/K^+)ATPase$ (adaptado de Yatime, *et al* 2011).

São conhecidas quatro isoformas da subunidade α , são elas: α_1 , α_2 , α_3 e α_4 . A isoforma α_1 é a mais abundante e ubíqua na sua distribuição celular. A expressão das restantes isoformas parece mais específica e restrita a determinados tecidos. A isoforma

α_2 é expressa com mais abundância no músculo cardíaco, no tecido adiposo e nas células da glia. A isoforma α_3 é encontrada em concentrações elevadas nos neurónios e no músculo cardíaco. Estas isoformas possuem diferentes propriedades cinéticas, bem como diferenças na sensibilidade a ubaína e afinidades para Na^+ , K^+ , e ATP (Kaplan, 2002).

Nos últimos anos, tem sido evidenciada a formação na membrana plasmática de estruturas oligoméricas constituídas por protómeros $(\alpha\beta)_n$ assegurada pela interação de um número variável de protómeros $\alpha\beta$, que conferem à $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ a capacidade de ativação adicional por altas concentrações de ATP (Boldyrev, 2001; Taniguchi, *et al.*, 2001; Kaplan, 2002).

A atividade de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ das membranas biológicas depende, entre outros fatores, da estrutura oligomérica da enzima, do empacotamento da bicamada lipídica e da microviscosidade do ambiente lipídico (Boldyrev, 2001; Taniguchi, *et al.*, 2001; Kaplan, 2002).

Alterações na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ têm sido implicadas no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas (Kairane, *et al.*, 2002).

Como já foi referido, a função de bombeamento da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é inibida especificamente pela ubaína. No entanto, vários estudos sugerem que as mesmas substâncias que inibem a função de bombeamento da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, são responsáveis pelo desencadeamento de vias de transdução de sinal mediadas pela $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. Em resposta à ubaína a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ interage com proteínas vizinhas para transmitir mensagens para complexos de transmissão intracelulares, como a mitocôndria e o núcleo (Xie & Askari, 2002; Liu, *et al.*, 2003; Aperia, 2007).

Vários estudos sugerem que o papel de bombeamento de iões Na^+ e K^+ e de sinalização da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ocorre dentro de cavéolas, microdomínios da membrana plasmática ricos em colesterol e proteína caveolina (Dalskov, *et al.*, 2005; Frank, *et al.*, 2008; Quintas, *et al.*, 2010). Estas estruturas parecem ser importantes na regulação do bombeamento e transdução do sinal da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Frank, *et al.*, 2008; Quintas, *et al.*, 2010).

Estudos têm mostrado que alterações no ambiente lipídico da (Na⁺/K⁺)ATPase neuronal em condições patológicas e experimentais, leva a uma interação mais apertada entre a enzima e a bicamada lipídica (Hattori, *et al.*, 1998, Frank, *et al.*, 2008; Quintas, *et al.*, 2010).

O colesterol pode afetar a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase alterando a fluidez da membrana ou interagindo diretamente com locais da enzima inibindo a sua atividade (Giraud, *et al.*, 1976).

1.3. O alumínio inibe a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase

Vários estudos têm mostrado o efeito inibitório da exposição de alumínio na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase (Sarin, *et al.*, 1997; Silva & Gonçalves, 2003; Silva, *et al.*, 2005; Bhadauria, 2012).

Embora o mecanismo não seja preciso, a exposição ao alumínio *in vivo* e *in vitro* diminui parcialmente a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase por altas concentrações de ATP, reduzindo a velocidade máxima da reação hidrolítica. O alumínio pode alterar o comportamento cinético da (Na⁺/K⁺)ATPase, tornando-a insensível a eventos de sinalização (Silva & Gonçalves, 2003).

Em 2005, Silva e colaboradores demonstraram que a exposição *in vivo* por via oral a 0,03 g AlCl₃/dia durante 4 meses está associada a alterações específicas na atividade e expressão das isoformas da (Na⁺/K⁺)ATPase (Silva, *et al.*, 2005).

O alumínio parece atuar como um inibidor não competitivo da hidrólise de ATP pela (Na⁺/K⁺)ATPase (Caspers, *et al.*, 1994; Silva, *et al.*, 2003).

Parece consensual que a possibilidade de formação de complexos estáveis de ATP-Al³⁺ e consequente redução da concentração do substrato da enzima, o ATP-Mg²⁺, pode justificar o efeito inibitório causado por exposição a elevadas concentrações de alumínio (Rensburg, *et al.*, 1997). Porém, Caspers e colaboradores (1990, 1993, 1994) verificaram que a inibição por concentrações micromolares de alumínio da (Na⁺/K⁺)ATPase é

caracterizada pela diminuição da velocidade máxima da hidrólise de ATP. Estes investigadores sugeriram que o alumínio promove a estabilização da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na forma fosforilada, potenciando a ligação da ubaína à enzima, ou seja, o alumínio pode atuar também como inibidor reversível não competitivo da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. A $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ possui uma estrutura quaternária complexa e as isoformas são caracterizadas por heterogeneidade estrutural e diferem tanto na sensibilidade à ubaína como no padrão de expressão em diferentes órgãos e tecidos, como foi referido anteriormente (Dostanic-Larson, *et al.*, 2006).

Silva e colaboradores (2005) verificaram que a exposição oral e prolongada a AlCl_3 induz a inibição da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sem alterar a expressão das isoformas da subunidade catalítica α_1 , α_2 e α_3 no cérebro e α_1 no rim. Por outro lado, o alumínio parece reduzir a atividade enzimática a concentrações submicromolares de ubaína. A formação na membrana plasmática de estruturas oligoméricas constituídas por protómeros $\alpha\beta$ parece conferir à $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ a capacidade de ativação adicional por altas concentrações de ATP (Boldyrev, 2001; Taniguchi, *et al.*, 2001; Kaplan, 2002).

Por conseguinte, também foi sugerido que a exposição a alumínio pode causar a diminuição do grau de oligomerização da enzima, diminuindo o número de protómeros que constituem a estrutura oligomérica da proteína integrada na membrana sinaptossomal, visto que concentrações submilimolares de alumínio apenas impedem a ativação adicional da atividade de $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ produzida pela ligação, de baixa afinidade, de ATP. Os mecanismos enunciados parecem revelar aspetos complementares da ação do alumínio que podem contribuir para o seu efeito inibitório na atividade hidrolítica de ATP da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Silva & Gonçalves, 2003).

Por outro lado, estudos apontam que reduções na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ estão relacionados com certas alterações no microambiente lipídico da membrana da enzima, nomeadamente transições de fase e alterações do volume hidrofóbico (Kairane, *et al.*, 2002; Mason, *et al.*, 2003).

Neste contexto é importante referir que vários investigadores sugeriram que os efeitos induzidos por alumínio ao nível da composição lipídica e fluidez da membrana

plasmática e da intensificação da peroxidação lipídica e proteica também podem causar a inibição da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Bondy, 2010; Bhadauria, 2012).

Sendo a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ um dos alvos do stress oxidativo neuronal e uma vez que o stress oxidativo é um dos eventos relacionados com processos neurodegenerativos, pode-se dizer que o meio ambiente lipídico da enzima pode ser diretamente modificado por peroxidação lipídica induzida em estados avançados da Doença de Alzheimer (Kairane, *et al.*, 2002).

1.4. A Importância do colesterol no cérebro

O colesterol é um componente essencial da membrana plasmática na maioria das células eucariotas, desempenhando um papel importante na regulação da fluidez da membrana, permeabilidade, na atividade de várias proteínas de membrana, e é o precursor de hormonas esteróides e ácidos biliares (Ledesma, *et al.*, 2006; Bionda, *et al.*, 2008; Gimpl, *et al.*, 2011).

O colesterol é transportado por lipoproteínas na circulação e pode ser absorvido a partir da dieta ou sintetizado intracelularmente por diferentes tecidos e órgãos tais como o fígado, cólon e cérebro (Kölsch, *et al.*, 2010; Mathew, *et al.*, 2011).

O cérebro é o órgão mais rico em colesterol no corpo humano, contendo cerca de 25% do colesterol total, sendo que várias vias estão envolvidas no transporte e armazenagem de colesterol no sistema nervoso central (SNC). No cérebro, o colesterol está localizado em membranas especializadas de mielina, células neuronais e gliais (Kölsch, *et al.*, 2010).

Este desempenha um papel importante nas propriedades físico-químicas das membranas neuronais, regulando enzimas de membrana, recetores e canais iónicos, juntamente com a endocitose e a expressão de antigénios (Mathew, *et al.*, 2011).

A estabilidade do colesterol afeta a fluidez das membranas celulares e a sinalização celular (Ledesma, *et al.*, 2006; Frank, *et al.*, 2008; Kölsch, *et al.*, 2010).

O colesterol tem sido implicado também, como componente essencial para a formação de microdomínios de membrana (Cuevas, 2007). Embora as dúvidas sobre a natureza desses microdomínios permaneçam, a sua existência e as proteínas envolvidas nestes são geralmente considerados essenciais para uma vasta gama de atividades no sistema nervoso, incluindo a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Dalskov, *et al.*, 2005; Frank, *et al.*, 2008; Quintas, *et al.*, 2010). Desta forma, não é surpreendente que muitas doenças do sistema nervoso envolvam o metabolismo de lípidos. Foi proposto que a proteína neurotóxica β -amilóide, que desempenha um papel fundamental na

Doença de Alzheimer, é produzida em microdomínios da membrana após a hidrólise da proteína precursora de amilóide (APP) (Frank, *et al.*, 2008).

Em 2000, Lynch e Mobley propuseram que a Doença de Alzheimer é causada por mudanças na absorção de colesterol celular e/ou metabolismo, que resultam num tráfego disfuncional de proteínas essenciais para a função e viabilidade neuronal (Lynch & Mobley, 2000).

Por outro lado, com o envelhecimento ocorrem alterações na membrana plasmática sináptica e a vulnerabilidade à intoxicação por alumínio parece aumentar (Savory, *et al.*, 1999).

Além disso, Silva e colaboradores mostraram que os efeitos neurotóxicos causados pelo alumínio podem também estar relacionados com mudanças na estrutura e função da membrana plasmática (Silva, *et al.*, 2002). Assim, a interação deste metal com os lipídios da membrana plasmática levam a uma alteração da estrutura e da função de várias proteínas, afetando desta forma, as vias de transdução de sinal (Silva, *et al.*, 2002; Pandya, *et al.*, 2004; Kaizer, *et al.*, 2007).

Os dados descritos na literatura fornecem a evidência clara de uma correlação entre a homeostase do colesterol e a disfunção dos recetores de neurotransmissores na patogênese de várias doenças neurodegenerativas (Maxfield & Tabas, 2005; Borisova, *et al.*, 2010).

Desta forma, uma alteração na dinâmica dos microdomínios enriquecidos com colesterol e esfingolípido na membrana plasmática dos neurónios e glia pode levar ao aparecimento e desenvolvimento de sintomas neurológicos alterando a função sináptica. A manipulação dos componentes lipídicos dos microdomínios da membrana plasmática dos neurónios pode fornecer uma nova abordagem para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Frank, *et al.*, 2008; Quintas, *et al.*, 2010).

1.5. Objetivo

Com o aumento da esperança média de vida da população aumentam também o número de casos de doenças neurodegenerativas crónicas. Sendo o alumínio um agente neurotóxico que pode estar envolvido em vários processos neurodegenerativos dando origem a patologias graves e sendo a sua disponibilidade cada vez mais frequente nos dias que correm, parece fundamental esclarecer os mecanismos pelos quais o alumínio produz citotoxicidade (Albendea, *et al.*, 2007; Bhadauria, 2012).

O alumínio é conhecido por alterar substancialmente a atividade de várias enzimas chave no sistema nervoso central. Como é o caso da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, a exposição a alumínio diminui a atividade desta enzima (Silva & Gonçalves, 2003).

Estudos anteriores mostraram que a exposição crónica na dieta a alumínio, produz fluidificação das membranas reduzindo a razão molar de colesterol/fosfolípido nos sinaptossomas e inibindo a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sem alteração concomitante da expressão da subunidade catalítica da proteína (Silva, *et al.*, 2002).

Tendo em conta que o colesterol parece influenciar o efeito inibitório do alumínio sobre a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, este estudo tem por objetivo distinguir claramente se os diferentes níveis de colesterol nas membranas afeta a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ nos sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato, na ausência e na presença de alumínio *in vitro*.

2. Material e Métodos

2.1. Isolamento de sinaptossomas a partir de córtex cerebral de ratos

Os sinaptossomas foram preparados de acordo com o método de Hajós (1975) e modificado por Carvalho e Carvalho (1979). Os ratos Wistar, foram mantidos em gaiolas numa câmara “Flufrance – A 130SN – Rech” com humidade ($50\pm 10\%$) e temperatura ($20\pm 1^\circ\text{C}$) controladas. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração “Panlab AO4” e água potável.

Os ratos foram sacrificados por distensão cervical, seguida de decapitação. Após remoção do cerebelo, o cérebro foi dissecado segundo o sulco inter-hemisférico para permitir a ablação das regiões hipocâmpais, bem como para facilitar a separação das meninges e massa branca. O tecido obtido foi fragmentado e homogeneizado em nove volumes de sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. As homogeneizações foram efetuadas num homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com pistão de Teflon, a 600 rotações por minuto. Estas operações foram realizadas à temperatura de 0 a 4°C . O homogeneizado de córtex cerebral foi submetido a uma série de centrifugações diferenciais sempre à temperatura de 4°C . A primeira centrifugação foi realizada a $1.500\times g$ durante 10 minutos.

O sedimento, que contém a fração sinaptossomal não purificada, após ressuspensão em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4, foi aplicado sobre uma coluna de sacarose 0,8 M previamente preparada nos tubos de centrifugação. Após centrifugação ($9.000\times g$ durante 20 minutos) em gradiente descontínuo de sacarose, a fração sinaptossomal encontra-se dispersa na camada de sacarose 0,8 M. Esta fração foi recolhida, diluída em igual volume de água desionizada e centrifugada a $20.000\times g$ durante 30 minutos. Por fim, procedeu-se à ressuspensão do sedimento resultante em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. As frações sinaptossomais obtidas foram congeladas e mantidas a -80°C até utilização (Figura 3).

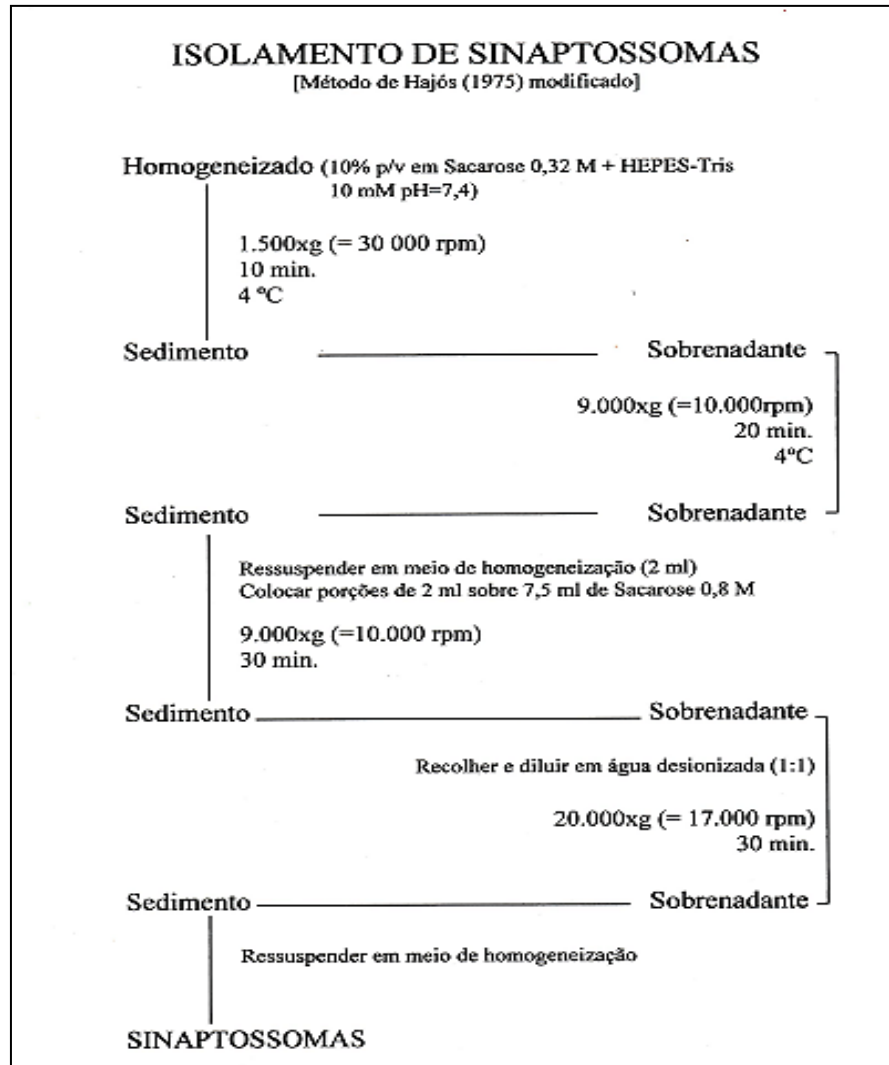


Figura 3: Esquema do método de isolamento da fração sinaptossomal de córtex cerebral de rato (adaptado do método de Hájos, 1975).

2.2. Quantificação de proteína

A determinação da concentração de proteína das preparações de sinaptossomas foi efetuada segundo o método colorimétrico descrito por Layne (1957). Em meio

fortemente básico, o íon Cu^{2+} reage com os grupos amina das proteínas, formando um complexo de cor violeta.

Amostras (50 μl) foram solubilizadas com 50 μl de dodesilsulfato de sódio (SDS) a 10% e a reação colorimétrica foi iniciada com a adição de 2 ml de Reagente de Biureto (sulfato de cobre hidratado a 0,15 %, tartarato de sódio e potássio a 0,6 %, hidróxido de sódio a 3 % e iodeto de potássio a 0,1 %). As reações decorreram durante 15 minutos. Simultaneamente nas mesmas condições das amostras, foram preparados padrões de albumina sérica bovina (0,4%) de concentrações conhecidas (10 mg/ml e 20 mg/ml). As absorvâncias foram determinadas ao comprimento de onda de 540 nm num espectrofotômetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14P”. Os valores da concentração de proteína das amostras foram obtidos por interpolação após traçado da curva de calibração de albumina sérica bovina e expressas em mg de proteína/ml.

2.3. Depleção de colesterol

A depleção de colesterol foi efetuada segundo o método de Borisova (2010). Para proceder à depleção de colesterol dos sinaptossomas utilizou-se o composto metil- β -ciclodextrina, devido à sua capacidade para alterar a composição lipídica celular e interromper as “rafts” lipídicas, extraíndo o colesterol da membrana plasmática, em detrimento de outros lípidos da membrana. Este composto é muito utilizado na pesquisa de “rafts” lipídicas, uma vez que o colesterol pode levar à segregação em larga escala de domínios da membrana e a mudanças imprevisíveis nos eventos de transdução de sinal (Gimpl, 2011).

Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) foram incubados durante 30 minutos a 35°C em banho seco com agitação constante (800 rpm) com metil- β -ciclodextrina 20 mM, obtida a partir de uma solução stock de M β CD 150 mM. De seguida as amostras foram lavadas com a solução PSS e centrifugadas a 20.000xg durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 0,32 M de sacarose e HEPES-Tris 10 mM, pH 7,4 num volume igual ao inicial. O PSS é uma solução salina contendo:

NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM, glucose 11 mM, HEPES 10 mM a pH 7,4. Esta solução foi filtrada através de um filtro Millipore 0,22 µm e armazenada a -20°C.

2.4. Incorporação de colesterol

O composto metil-β-ciclodextrina, como já foi referido anteriormente é usado na depleção de colesterol na pesquisa de “rafts” lipídicas. No entanto, também tem a capacidade de incorporar o colesterol nas membranas plasmáticas, sendo usado tanto na depleção como na incorporação de colesterol (Borisova, *et al.*, 2010).

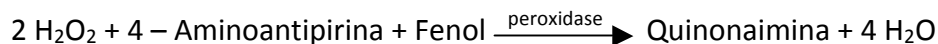
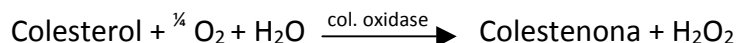
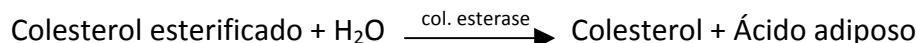
A incorporação de colesterol foi feita segundo o método modificado de Sooksawate (2001) e de Borisova (2011). Para a incorporação de colesterol nas membranas dos sinaptossomas foi preparado previamente um complexo Colesterol/MβCD (3 mM/30 mM) em PSS, em atmosfera de azoto e com agitação.

Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) foram incubados durante 30 minutos a 35°C em banho seco, com o complexo Colesterol/MβCD numa diluição 1:10. Após incubação os sinaptossomas foram lavados em PSS e centrifugados a 20.000xg durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense num volume igual ao inicial em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM, pH 7,4.

2.5. Quantificação de colesterol

A quantificação do colesterol foi realizada utilizando o kit comercial da BioSystems – Colesterol Oxidase/Peroxidase.

Este método baseia-se na ação de três enzimas sobre o colesterol esterificado e livre conduzindo à formação de um complexo de quinonaimina colorido quantificável por espectrofotometria (Allain, *et al.*, 1974; Meittini, *et al.*, 1978).



Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) foram incubados com os reagentes do kit (reagente A: Reativo e reagente S: Padrão de colesterol) segundo as suas instruções e agitadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. O reagente A é constituído por cloreto de sódio 0,5mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterase > 0,2 U/ml, colesterol oxidase > 0,1 U/ml, peroxidase > 0,8 U/ml, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0 e o reagente S é constituído por 200 mg/dl de colesterol. As absorvâncias foram determinadas ao comprimento de onda de 500 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14P”. Os valores da concentração de colesterol das amostras foram obtidos a partir da seguinte fórmula e expressos em µg de colesterol/mg de proteína:

$$C_{\text{amostra}} = (A_{\text{amostra}} / A_{\text{padrão}}) \times C_{\text{padrão}}$$

2.6. Medição da atividade da adenosinatrifosfatase

A (Na⁺/K⁺)ATPase é uma enzima localizada na membrana plasmática com primordial importância na manutenção dos gradientes transmembranares de Na⁺ e K⁺, contribuindo também para o potencial de membrana (Toyoshima, *et al.*, 2011). Esta enzima utiliza ATP como fonte de energia para o transporte ativo de iões Na⁺ e K⁺, e é inibida especificamente por ubaína (Toyoshima, *et al.*, 2011).

A atividade da adenosinatrifosfatase das diferentes amostras foi determinada por quantificação do fosfato inorgânico (colorimetria) produzidos durante a hidrólise de ATP e dos protões (potenciometria).

Neste estudo foram utilizados, sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos Wistar, após congelamento em azoto líquido e descongelamento à temperatura

ambiente. Os sinaptossomas são frações subcelulares do tecido nervoso formadas pelos terminais nervosos pré-sináptico intactos que, possuem autonomia metabólica, funcionando como uma “mini-célula”. Sendo por isso um modelo experimental muito usado em neurotoxicologia. (Nicholls,1989).

O centro catalítico da (Na⁺/K⁺)ATPase não é acessível ao ATP extracelular, pois a membrana pré-sináptica é impermeável a ATP e o local de ligação deste substrato encontra-se exposto ao espaço intracelular. Por conseguinte, procedeu-se à prévia permeabilização da membrana sinaptossomal por congelamento/descongelamento, o que permite quantificar a atividade hidrolítica de ATP na fração sinaptossomal em condições de concentração inicial de ATP controladas. Nas condições experimentais usadas neste trabalho, a atividade hidrolítica de ATP da fração sinaptossomal é constante durante o tempo de reação (5 minutos) e diretamente proporcional à concentração de proteína da preparação biológica no meio de reação.

Colorimetria

A atividade de adenosinatrifosfatase foi determinada por quantificação do fosfato inorgânico produzido segundo o método de Taussky e Shorr (1953).



Assim, a 1 ml de meio de reação (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM a pH 7,4) foram adicionados 0,1 mg de sinaptossomas com ou sem AlCl₃ 300 μM, na presença ou ausência de ubaína 1 mM. A solução AlCl₃ foi preparada diariamente pouco tempo antes da realização das experiências.

Após incubação da amostra durante 15 min a 35°C, a reação foi desencadeada pela adição de Mg-ATP 1 mM e decorreu durante 5 minutos a 35°C em banho seco com agitação de 800 rpm, tendo sido finalizada pela adição de 250 μl de TCA 20% a 0°C e os tubos colocados em gelo. Após centrifugação durante 5 minutos a 3.000 rpm, procedeu-

se à quantificação do fosfato inorgânico em 500 µl de sobrenadante. A reação colorimétrica iniciou-se com a adição de Reagente de Molibdato (sulfato ferroso 5% e molibdato de amónio a 1% preparado em H₂SO₄ 1 N) e decorreu durante 5 minutos à temperatura ambiente. Simultaneamente foi preparada uma curva padrão de KH₂PO₄ (0 a 85 µM).

Na presença de molibdato de amónio, o Pi libertado forma um complexo de fosfomolibdato, que depois de reduzido pela ação de sulfato ferroso (KH₂PO₄) apresenta uma cor azul e pode ser detetada e quantificada espectrofotometricamente a 660 nm.

A quantidade de fosfato inorgânico produzido durante as reações foi calculada a partir da curva padrão.

A atividade assim medida foi designada atividade ATPásica Total. A atividade ATPásica Basal foi medida na presença de 1 mM de ubaína (inibidor específico da (Na⁺/K⁺)ATPase). A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase foi determinada considerando a diferença entre a ATPase Total e a Basal e foi expressa em nmol de Pi/mg de proteína/min.

Potenciometria

Os métodos potenciométricos permitem o registo contínuo e extremamente rigoroso de pequenas alterações de pH no meio, quando este é muito pouco tamponizado e os eléctrodos utilizados são muito sensíveis. Desde que sejam mantidas constantes as condições relativas à temperatura (30-37°C), ionicidade e pH (6,9-7,4), as variações de pH resultantes da hidrólise de ATP podem servir para quantificar a atividade de ATPase. Os efeitos do colesterol na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal foram registados continuamente segundo o método potenciométrico descrito por Madeira *et al.* (1974). Para o efeito, as variações da concentração de H⁺, foram detetadas por um eléctrodo “Ingold U 402 – M6 – S7 – 100”, conectado a um electrómetro “Crison micro pH 2002” em 2 ml de meio de reação (NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,2 mM, EGTA 100 µM, HEPES-Na 2 mM a pH 7,4), a 35°C e com agitação magnética constante. Todas as reações decorreram na presença de 0,3 mg de proteína e foram iniciadas pela adição de Mg-ATP 1

mM, previamente ajustado a pH 7,4. Todos os ensaios foram calibrados pela adição de 50 μ l de HCl 3 mM (150 nmol de H⁺).

Tal como referido anteriormente, a ubaína foi utilizada para discernir a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase.

A Figura 4 ilustra os registos obtidos por este método no grupo controlo na ausência (Fig. 4.A) e na presença de ubaína 1 mM (Fig. 4.B).

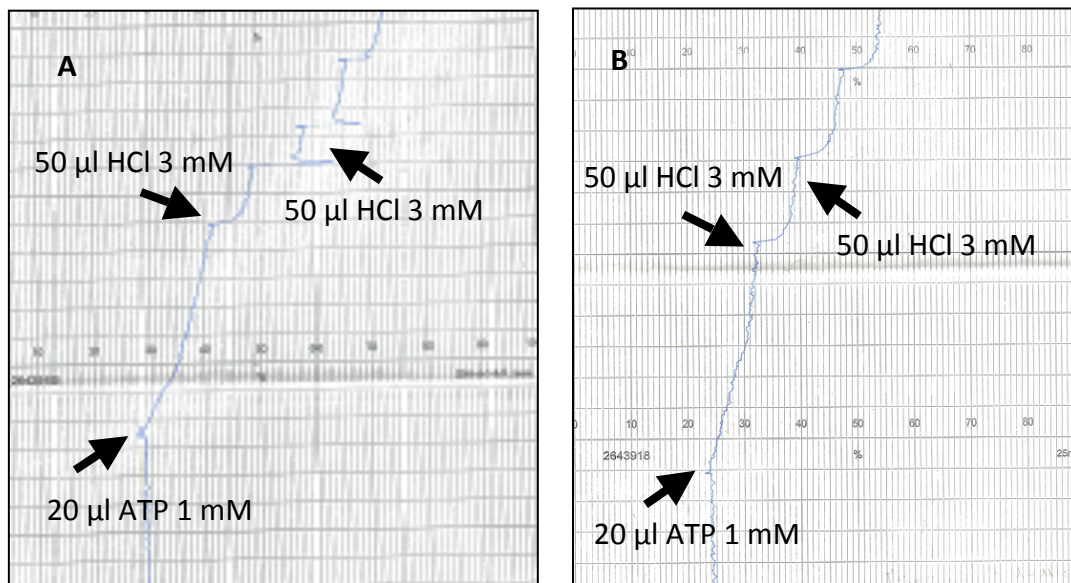


Figura 4: Registro da atividade ATPásica de sinaptossomas controlo na ausência (A) e na presença de ubainá (B).

2.7. Análise estatística dos dados

Os resultados apresentados neste trabalho representam a média \pm o erro padrão da média do número de experiências indicado nas legendas das figuras. Os dados foram tratados estatisticamente com o programa de computador "Microcal™ Origin 6.0". A significância estatística entre dois grupos foi determinada pelo teste *t de Student*. Os valores de *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ foram considerados representativos de diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados e Discussão

O principal objetivo deste trabalho foi esclarecer de que forma os diferentes níveis de colesterol afetam o efeito inibitório do alumínio na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal ocorrido durante ensaios *in vitro* (incubação com AlCl_3).

Neste estudo foram utilizados três grupos experimentais, na ausência e na presença de AlCl_3 300 μM , o controle, a incorporação de colesterol e a depleção de colesterol. O controle não sofreu qualquer alteração do teor de colesterol nas membranas dos sinaptossomas. Por outro lado, na incorporação foi provocado o aumento do teor de colesterol nas membranas dos sinaptossomas e na depleção foi provocada a redução de colesterol.

Em 2003, Silva e colaboradores mostraram que a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal é inibida por AlCl_3 , de uma maneira dependente da concentração (Silva & Gonçalves, 2003). Na presença de concentrações saturantes de Mg-ATP (500 μM), o AlCl_3 30 μM causou uma inibição de 30% da atividade hidrolítica, após incubação com AlCl_3 300 μM registou-se o efeito inibitório máximo (~60%) (Figura 5).

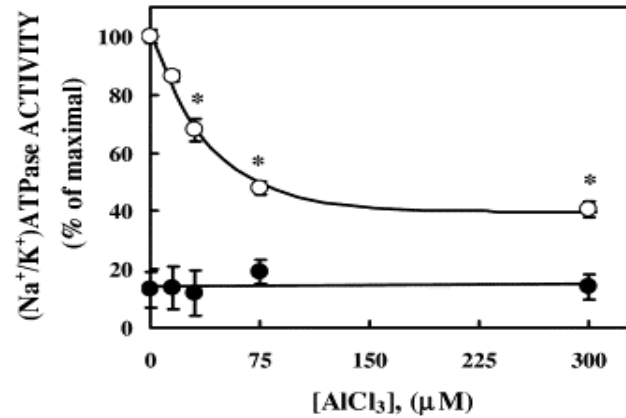


Figura 5: Efeito da exposição *in vitro* a alumínio na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal (adaptado de Silva & Gonçalves, 2003).

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 5 minutos a 35°C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de concentrações crescentes de AlCl₃ (0-300 μM). As reações foram iniciadas pela adição de Mg-ATP de forma a obter uma concentração final de 500 μM (○) ou de 5 μM (●). As reacções foram finalizadas após 5 minutos e a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase foi quantificada pelo método colorimétrico tal como descrito em Material e métodos. Os valores da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase são expressos em percentagem e são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 6 determinações independentes. *p < 0,01.

3.1. Alteração dos níveis de colesterol da membrana dos sinaptossomas

Como foi referido anteriormente, os sinaptossomas foram submetidos a três condições (controlo, incorporação de colesterol ou depleção de colesterol) na ausência e na presença de 300 μM de alumínio, uma vez que esta concentração de alumínio promoveu a inibição máxima da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, sendo por isso a escolhida (Figura 5).

As ciclodextrinas ou derivados, como M β CD, aumentam a solubilidade das substâncias não polares, como o colesterol, incorporando-as na sua cavidade hidrofóbica e não covalente formando um complexo de inclusão solúvel em água. Sendo usadas como um transportador de colesterol, tanto na incorporação como na depleção de colesterol nas membranas plasmáticas (Bionda, *et al.*, 2008; Borisova, *et al.*, 2010, Gimpl, *et al.*, 2011).

De forma a incorporar o colesterol na membrana plasmática dos sinaptossomas, 5 mg de proteína/ml foram incubados com um complexo Colesterol/M β CD (0,3 mM/3 mM). Sendo possível observar na Figura 6, que houve um aumento de ~70% dos níveis de colesterol na membrana sinaptossomal ($279 \pm 54 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína) em relação ao grupo controlo ($183 \pm 48 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína).

Por outro lado, a depleção de colesterol na membrana sinaptossomal foi conseguida usando apenas M β CD (20 mM), tal como descrito na secção de Material e Métodos. Assim, foi possível obter uma redução de colesterol ($57 \pm 16 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína) de cerca de ~62% em relação ao controlo ($183 \pm 48 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína), tal como se pode observar na Figura 6.

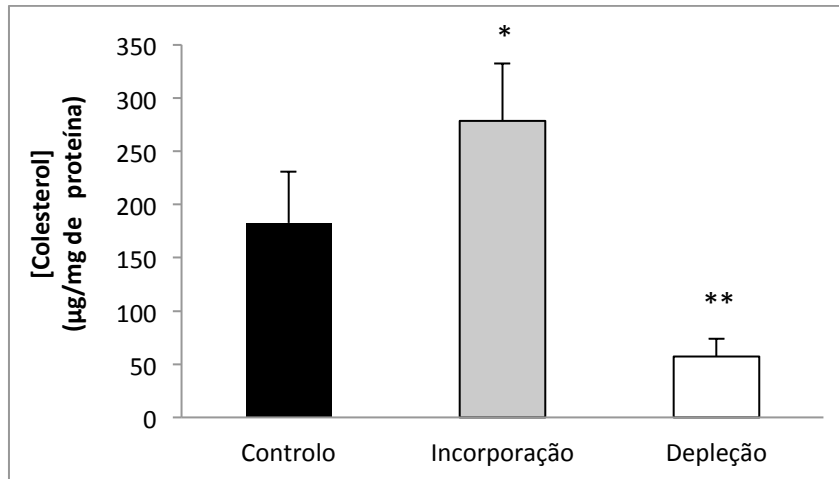


Figura 6: Concentração de colesterol na membrana de sinaptossomas de córtex cerebral de rato.

Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 35 minutos a 35°C com agitação constante (800 rpm) (controle ■). Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) nas mesmas condições foram incubados com um complexo Colesterol/M β CD (0,3 mM/3 mM) (Incorporação ■) e com M β CD (20 mM) (Depleção □). Após os 35 minutos de incubação os sinaptossomas foram lavados numa solução de PSS (NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 500 mM, MgCl₂ 250 mM, glucose 11 mM) e centrifugados a 20.000xg durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante rejeitado e o sedimento ressuspensos em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM pH 7,4, procedendo-se à quantificação de colesterol, descrita anteriormente em Material e Métodos. Os valores da concentração de colesterol são expressos em µg/mg de proteína e são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 6 determinações independentes. *p < 0,05 e **p < 0,01 estatisticamente diferentes do controle.

A concentração de M β CD utilizada para proceder à depleção de colesterol foi de 20 mM. Esta concentração foi escolhida tendo por base um estudo prévio realizado no laboratório, cujo objetivo foi testar as diferentes concentrações de M β CD na depleção de colesterol nas membranas dos sinaptossomas. Sendo visível na Figura 7, que a utilização de uma concentração de 20 mM de M β CD diminuiu 62% os níveis de colesterol nas membranas dos sinaptossomas. Por isso, foi a concentração escolhida para a realização deste estudo.

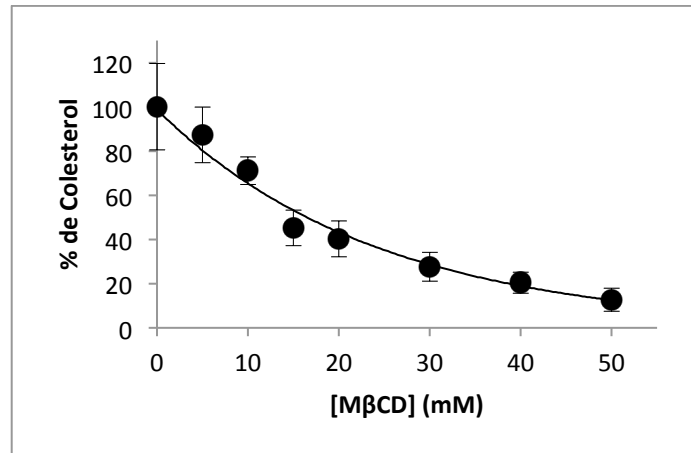


Figura 7: Efeito das diferentes concentrações de MβCD nos níveis de colesterol das membranas de sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de rato.

Os sinaptossomas (5 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 35 minutos a 35°C com agitação constante (800 rpm) com diferentes concentrações de MβCD (5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mM). Após o tempo de incubação procedeu-se à lavagem e centrifugação das amostras. De seguida, efetuou-se a quantificação do colesterol, descrita anteriormente em Material e Métodos. Os valores da concentração de colesterol são expressos em % e são apresentados como a média \pm o erro padrão da média.

O colesterol é um componente importante das membranas plasmáticas, tem um importante papel na estrutura e regulação da bicamada lipídica, sendo que alteração dos níveis de colesterol pode levar a eventos prejudiciais para a célula. É sabido que aumento dos níveis de colesterol bem como reduções têm efeitos graves na membrana plasmática, como alterações da fluidez e permeabilidade da membrana, influenciando a atividade de proteínas de membrana (Ledesma, *et al.*, 2006; Cuevas, 2007; Bionda, *et al.*, 2008).

3.2. Determinação da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal no grupo controle

A (Na⁺/K⁺)ATPase utiliza o ATP como fonte de energia para o transporte ativo dos íons Na⁺ e o K⁺, e é inibida especificamente por ubaína (Yatime, *et al.*, 2011).

A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal foi medida por colorimetria e por potenciometria, como já foi referido anteriormente.

A Figura 8 ilustra a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase registada por quantificação do fosfato inorgânico (colorimetria). A atividade ATPásica total (sem ubaína) obtida foi de 616,93 ± 195,77 nmoles de Pi/min/mg de proteína, a atividade ATPásica basal (com ubaína 1 mM) foi de 289 ± 105,76 nmoles de Pi/min/mg de proteína, sendo visível a ação inibitória da ubaína. A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal foi determinada pela diferença entre a atividade ATPásica total e a basal e foi de 327,07 ± 88,87 nmoles de Pi/min/mg de proteína na ausência de alumínio.

Silva e Gonçalves, em 2003, obtiveram uma atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase na ausência de alumínio superior de ~281 nmol Pi/min/mg proteína (Silva & Gonçalves, 2003). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho (327,07 ± 88,87 nmoles de Pi/min/mg de proteína).

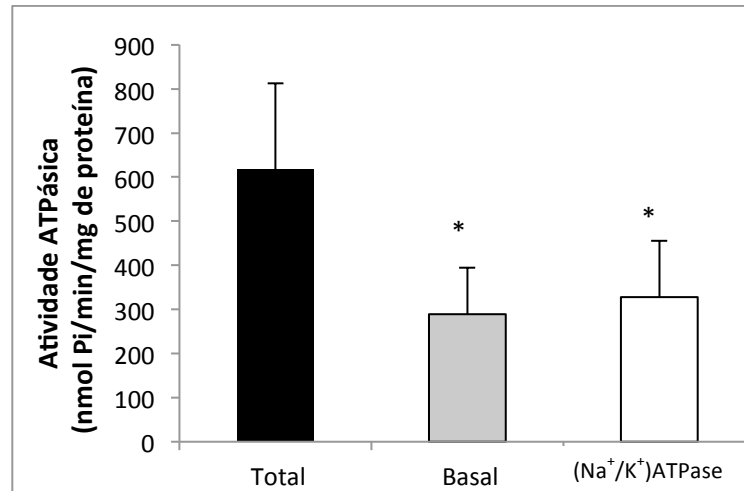


Figura 8: Determinação da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal no grupo controlo na ausência de alumínio por colorimetria.

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 15 minutos a 35°C e agitação constante, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência de ubaína (Total ■) e na presença de ubaína 1 mM (Basal □) As reações foram iniciadas pela adição de Mg-ATP 1 mM. Após 5 minutos a reação foi finalizada pela adição de TCA a 20%. A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase (□) foi determinada considerando a diferença entre a ATPase Total e a Basal. Os valores da atividade ATPásica são expressos em nmol Pi/min/mg de proteína e são apresentados como a média ± o erro padrão de ~6 determinações independentes. * p < 0,05.

Na Figura 9 está representada a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal por potenciometria do grupo controlo sem alumínio. A atividade ATPásica total foi determinada na ausência de ubaína, como na colorimetria, e foi de 60,35 ± 11,27 nmoles de H⁺/min/mg de proteína, enquanto a atividade ATPásica basal foi determinada na presença de ubaína, podendo verificar que a ubaína inibiu a atividade ATPásica para 41,50 ± 9,11 nmoles de H⁺/min/mg de proteína. A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal foi considerada como a diferença entre a atividade ATPásica total e a basal e o seu valor foi de 18,75 ± 8,38 nmoles de H⁺/min/mg de proteína.

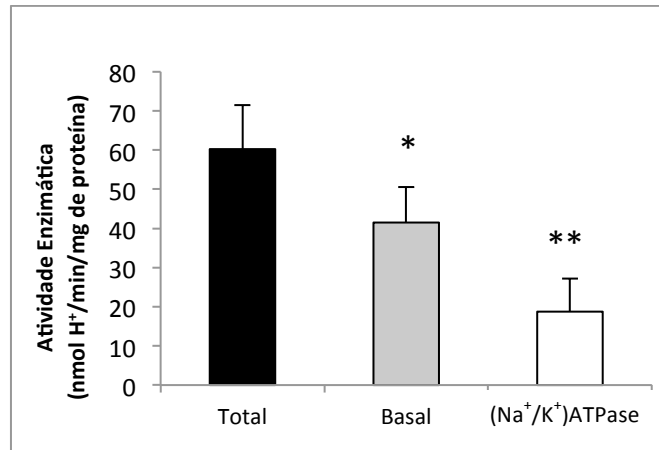


Figura 9: Determinação da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal no grupo controlo na ausência de alumínio por potenciometria.

Os sinaptossomas (0,15 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos a 35°C com agitação magnética num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 2 mM (pH 7,4) na ausência de ubaína (Total ■) e na presença de ubaína 1 mM (Basal □). As reações foram iniciadas pela adição de Mg-ATP 1 mM. A atividade (Na⁺/K⁺)ATPase (□) foi determinada considerando a diferença entre a ATPase Total e a Basal. Os valores da atividade ATPásica são expressos em nmol H⁺/min/mg de proteína e são apresentados como a média ± o erro padrão de ~6 determinações independentes. ** p < 0,01 e * p < 0,05.

3.3. Efeito do colesterol na ação do alumínio sobre a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase

Como se pode observar na Figura 10, a (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal é inibida por alumínio. A inibição por AlCl₃ na gama de concentrações submilimolares é apenas parcial e requer elevadas concentrações de ATP. Na presença de Mg-ATP 500 μM, que corresponde à concentração de substrato saturante, a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase é inibida maximamente (~60%) para concentrações de AlCl₃ superiores a 150 μM (Silva & Gonçalves, 2003).

Silva e colaboradores (2005) observaram que a diminuição da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase induzida por exposição *in vivo* a AlCl₃ é assegurada pela inibição parcial das isozimas que contêm as subunidades catalíticas α₁, α₂ e α₃, ocorrendo redução da sensibilidade da atividade enzimática a concentrações submicromolares de ubaína.

A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal, foi determinada nos três grupos: controlo, incorporação e depleção de colesterol, na ausência e na presença de AlCl₃ 300 μM.

Como é possível observar na Figura 10, o grupo controlo teve uma atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal de 327,07 ± 88,87 nmoles de Pi/min/mg de proteína na ausência de AlCl₃, enquanto que na presença de AlCl₃ 300 μM registou-se uma atividade de 77,20 ± 6,98 nmoles de Pi/min/mg de proteína. O estudo efetuado mostrou uma redução de 76,39% da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase nos sinaptossomas expostos *in vitro* a alumínio.

Por outro lado, o grupo sujeito à incorporação de colesterol teve atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal muito reduzida, quer na ausência quer na presença de AlCl₃ 300 μM. A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal registada neste grupo na ausência de alumínio foi de 15,89 ± 1,66 nmoles de Pi/min/mg de proteína, enquanto que na presença de AlCl₃ a atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase sinaptossomal foi de 4,31 ± 1,48 nmoles de Pi/min/mg de proteína. Apesar da baixa atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase

sinaptossomal neste grupo, foi possível verificar que na presença de AlCl_3 300 μM a atividade desta enzima foi ainda menor (Figura 10).

Enquanto, no grupo em que os níveis de colesterol foram reduzidos para ~62%, registou-se uma atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal de $299,11 \pm 35,85$ nmoles de $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína na ausência de alumínio. Na presença de AlCl_3 300 μM a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal, neste grupo teve uma inibição menor ($185,99 \pm 7,93$ nmoles de $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) do que no grupo controlo exposto ao alumínio ($77,50 \pm 8,96$ de $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).

Estes resultados, sugerem que, a ação do alumínio sobre a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ depende dos níveis de colesterol da membrana, uma vez que níveis elevados de colesterol diminuiriam significativamente a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ e que baixos níveis de colesterol não permitiram um efeito inibitório tão elevado do alumínio sobre a atividade $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal.

Em 2002, Silva e colaboradores, usando sinaptossomas isolados de córtex cerebral de ratos expostos à dieta de alumínio e de colestipol (fármaco redutor de colesterol), conseguiram avaliar o efeito da razão molar do colesterol e fosfolípidos na acumulação de alumínio e nas alterações induzidas por alumínio na fluidez da membrana em terminais nervosos. Este estudo revelou que a suscetibilidade à intoxicação por alumínio na dieta pode ser condicionada pelo colesterol, uma vez que, a exposição oral crónica a alumínio reduziu a razão molar colesterol/fosfolípidos em sinaptossomas (Silva, *et al.*, 2002).

De fato, este estudo mostrou que após a exposição *in vivo* a doses elevadas de alumínio na dieta, a acumulação deste metal nos terminais nervosos era menor quando os níveis de colesterol nos sinaptossomas eram baixos. A ingestão de colestipol (reductor de colesterol) preveniu o aumento da razão molar de CH/PL sinaptossomal e conduziu a uma diminuição proporcional no conteúdo em alumínio dos sinaptossomas (Silva, *et al.*, 2002).

Por outro lado, vários investigadores têm mostrado que $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é um alvo do stress oxidativo neuronal e que este está diretamente envolvido na patogénese da Doença de Alzheimer e que o alumínio parece aumentar a peroxidação lipídica, alterando o ambiente lipídico da membrana afetando a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. Alterações no ambiente lipídico da membrana em condições patológicas e experimentais parecem conduzir a uma interação mais apertada da enzima com a bicamada lipídica. Podendo interferir com o grau de oligomerização da enzima, diminuindo o número de protómeros que constituem a estrutura oligomérica da proteína integrada na membrana, resultando no declínio da cooperatividade para catiões, nucleótidos e outros ligandos reguladores (Chakraborty, *et al*, 2003; Silva & Gonçalves, 2003; Sethi, *et al*, 2008).

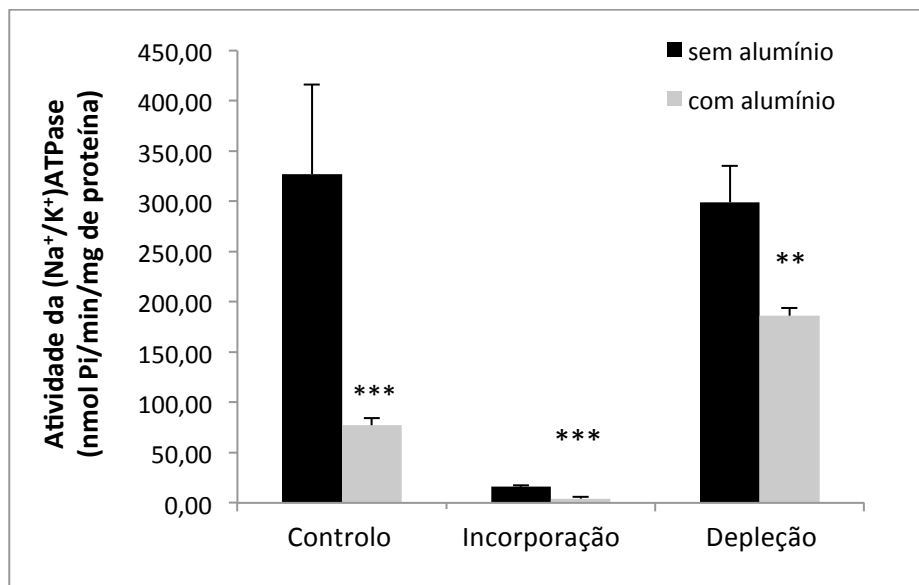


Figura 10: Efeito da exposição *in vitro* a alumínio e dos diferentes níveis de colesterol na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ registados por colorimetria.

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 15 minutos a 35°C , num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de AlCl_3 300 μM . As reações foram iniciadas pela adição de Mg-ATP 1 mM. A reação foi finalizada após 5 minutos pela adição de TCA a 20% e o Pi foi quantificado tal como descrito anteriormente em Material e Métodos. A atividade ATPásica foi medida na ausência e na presença de ubaína 1 mM. Os resultados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de ~6 determinações independentes, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Na Figura 11 está representada a percentagem de inibição da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal na presença de alumínio. É possível verificar que o alumínio no grupo controlo, onde não houve alteração do teor de colesterol, provocou uma inibição na $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal de 76,39%. Quando o teor de colesterol da membrana foi aumentado em 72,88%, o alumínio teve uma inibição $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal de ~71%. Por outro lado, quando o teor de colesterol foi reduzido em 62%, o alumínio teve um efeito inibitório sobre a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ menor, de 37,82%.

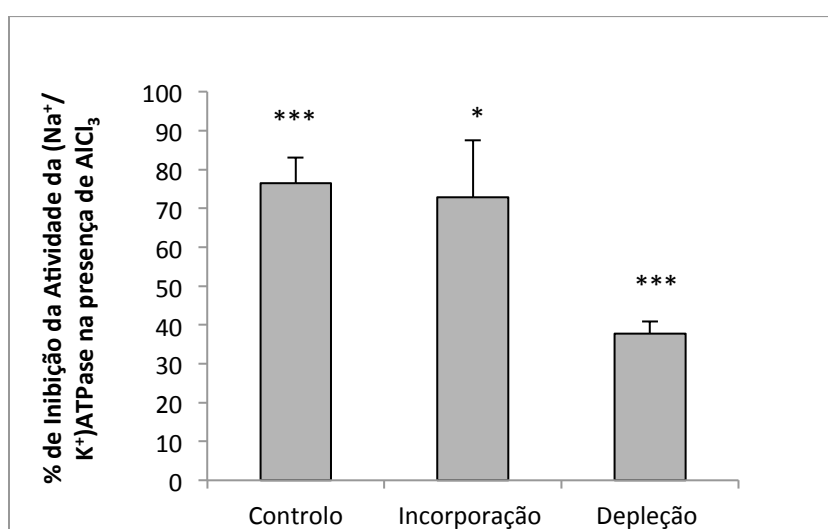


Figura 11: Percentagem de inibição da atividade $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal na exposição *in vitro* a alumínio.

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35°C , num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de AlCl_3 300 μM . As reações foram iniciadas pela adição de Mg-ATP 1 mM. A reação foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o Pi foi quantificado tal como descrito anteriormente em Material e Métodos. A atividade foi medida na presença de ubaína 1 mM. A $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ foi determinada considerando a diferença entre a ATPase total e basal. Os resultados são apresentados em percentagem de inibição como a média \pm o erro padrão da média de ~6 determinações independentes, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Como é visível na Figura 12, pelo método potenciométrico, no grupo controle a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal na ausência de AlCl_3 foi de $18,75 \pm 8,38$ nmoles de $\text{H}^+/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, enquanto que na presença de AlCl_3 $300 \mu\text{M}$ a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal registrada foi de $4 \pm 4,2$ nmoles de $\text{H}^+/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, o que significa que na presença de AlCl_3 $300 \mu\text{M}$ houve uma inibição de 77,7% da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pelo método espectrofotométrico, em que a percentagem de inibição da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal provocada pelo alumínio foi de 76,39.

Por outro lado, não se observou atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal no grupo onde os níveis de colesterol foram aumentados para $279 \pm 54 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína (incorporação de colesterol), tanto na ausência como na presença de AlCl_3 $300 \mu\text{M}$ a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal foi de 0 nmol de $\text{H}^+/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. O que também está de acordo com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico, uma vez que a atividade $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal registrada neste método foi reduzida quer nos sinaptossomas expostos e não expostos a alumínio. O aumento de 70% do colesterol nas membranas dos sinaptossomas reduziu a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, sendo o seu efeito prejudicial para a atividade desta enzima.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que mostram que o aumento do colesterol tem uma grande influência na atividade de várias enzimas como é o caso da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, estes resultados realçam a importância do colesterol na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Mayoll, 1999; Cornelius, 2001; Mason, *et al.*, 2003; Gutierrez, *et al.*, 2012).

Segundo Gutierrez e colaboradores, uma dieta rica em colesterol induz uma excessiva peroxidação lipídica, levando a uma diminuição da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. A atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ é rapidamente alterada pelo stress oxidativo quer através da alteração do microambiente lipídico da membrana ou pelo dano direto da proteína (Gutierrez, *et al.*, 2012).

O enriquecimento de colesterol nas membranas plasmáticas altera o comportamento cinético da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$, afetando tanto a sua ativação por Na^+ , como as características da fosforilação/desfosforilação e o nível de fosforilação estável (Mayoll, 1999; Cornelius, 2001; Mason, *et al.*, 2003).

Na depleção de colesterol, na ausência de AlCl_3 , a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal registada foi de 17 ± 5 nmoles de H^+ /min/mg de proteína, enquanto que na presença de AlCl_3 300 μM a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal foi de 11 ± 2 nmoles de H^+ /min/mg de proteína. Neste grupo, na presença de AlCl_3 300 μM , houve uma inibição da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal de 35,29%.

Pelos dois métodos (colorimetria e potenciometria), verificou-se que na presença de baixos níveis de colesterol o efeito inibitório do alumínio sobre a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ sinaptossomal é menor do que no grupo controlo e na incorporação de colesterol.

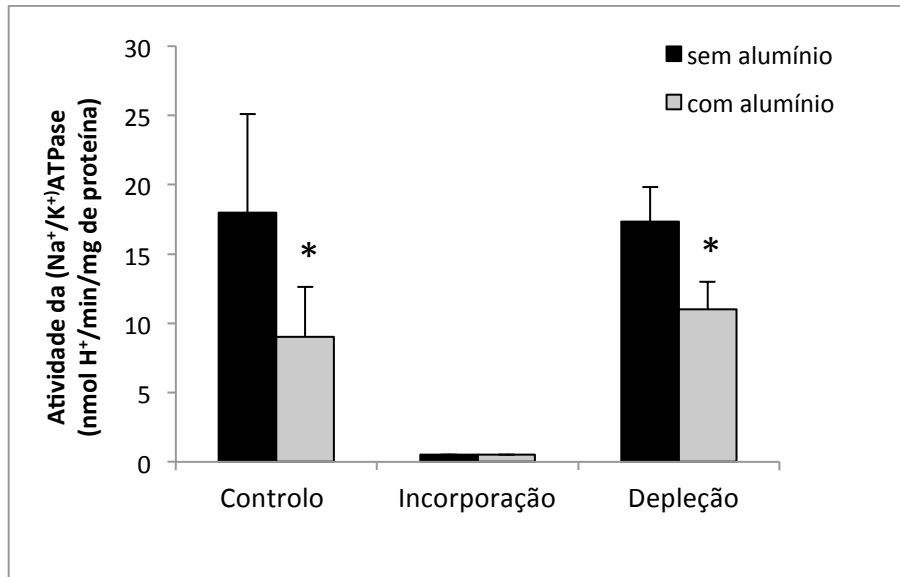


Figura 12: Efeito da exposição *in vitro* a alumínio e dos diferentes níveis de colesterol na atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase registados por potenciometria.

Os sinaptossomas (0,15 mg de proteína/ml) isolados a partir de córtex cerebral de rato foram incubados durante 15 minutos a 35°C com agitação constante num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 2 mM (pH 7,4), na ausência e na presença de AlCl₃ 300 μM. As reações foram iniciadas pela adição de 1 mM de Mg-ATP na ausência e na presença de 1 mM de ubaína. A atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase foi determinada considerando a diferença entre a ATPase Total e a Basal. Os valores da atividade ATPásica são expressos em nmol H⁺/min/mg de proteína e são apresentados como a média ± o erro padrão da média de ~4 determinações independentes. * p < 0,05.

Este estudo revelou que a exposição *in vitro* dos sinaptossomas a alumínio, na presença de baixos níveis de colesterol levou a uma menor inibição da atividade da (Na⁺/K⁺)ATPase, como Silva e colaboradores já tinham demonstrado em estudos *in vivo* (Silva, *et al.*, 2002).

A acumulação anormal de colesterol tem efeitos deletérios sobre a função da membrana, incluindo a interrupção de mecanismo de transporte de iões (Frank, *et al.*, 2008).

Este estudo mostrou que o enriquecimento em colesterol na membrana sinaptossomal reduziu significativamente a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$.

Vários investigadores observaram o mesmo efeito do enriquecimento em colesterol nas membranas celulares na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em várias células, como eritrócitos, células endoteliais e células renais (Mayol, *et al.*, 1999; Mason, *et al.*, 2003; Silva & Gonçalves, 2003).

O colesterol é normalmente associado com domínios da membrana (“pools”), responsáveis por modular a atividade de proteínas da membrana. Estes domínios da membrana ricos em colesterol parecem desempenhar um papel crucial na função celular que inclui a transdução de sinal, a adesão celular e tráfego de componentes da membrana (Mason, *et al.*, 2003).

O efeito do alumínio sobre a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ foi avaliado também em esferoplastos isolados de *Escherichia coli*, uma vez que a sua membrana interna não contém colesterol. A $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de esferoplastos preparados a partir de células de *E. coli* anteriormente expostos a concentrações submillimolar AlCl_3 manteve-se idêntica à medida em condições de controlo. Além disso, a inibição induzida por alumínio da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ foi observada quando AlCl_3 (gama micromolar) foi adicionado diretamente ao meio de reação (Moraes, 2007).

Estes resultados, apontam para que o colesterol desempenhe um papel importante na inibição induzida por alumínio na atividade desta enzima e que a manipulação do teor de colesterol nas membranas pode ajudar a minimizar o efeito neurotóxico do alumínio.

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram evidenciar a participação do colesterol no efeito inibitório do alumínio na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ em terminais nervosos isolados (sinaptossomas) a partir do córtex cerebral do rato.

Nos sinaptossomas controlo que contêm um teor de colesterol de $183 \pm 48 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína, a exposição *in vitro* a AlCl_3 $300 \mu\text{M}$ levou a uma inibição da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de 76,39%.

Enquanto que, na presença de $279 \pm 54 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína (incorporação de colesterol) o alumínio teve um efeito inibitório da atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de 72,88%.

Por outro lado, para baixos níveis de colesterol ($57 \pm 16 \mu\text{g}$ de colesterol/mg de proteína) o alumínio teve um efeito inibitório na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ de 37,82%.

O aumento de ~70% do teor de colesterol na membrana sinaptossomal diminuiu drasticamente a atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ na ausência e na presença de AlCl_3 $300 \mu\text{M}$.

Pelo contrário reduções de ~62% do teor de colesterol na membrana sinaptossomal diminuíram o efeito inibitório do alumínio na atividade da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$,

Estes resultados apoiam o facto de o colesterol ser um componente essencial na ação neurotóxica do alumínio sobre a $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$.

Em conclusão, os resultados obtidos suportam a hipótese proposta por outros investigadores de que o efeito do alumínio sobre $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ implica a redução da oligomerização das enzimas, diminuindo o número de protómeros que constituem a estrutura oligomérica da proteína integrada na membrana sinaptossomal.

5. Bibliografia

Albendea, C.D., Gómez-Trullén, E.M., Fuentes-Broto, L., Miana-Mena, F.J., Millán-Plano, S., Reyes-Gonzales, M.C., Martínez-Ballarín, E., García, J., 2007. Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminium. *Trace Elem. Med. and Biol.* 21, 261-268.

Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C. S.G., Richmond, W., Fu, P.C., 1974. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* 20/4, 470-475.

Aperia A., 2007. New roles for an old enzyme: (Na⁺/K⁺)ATPase emerges as an interesting drug target. *J. Intern. Med.* 261, 44–52.

Beauchemin, D., Kisilevsky, R., 1998. A Method on ICP-MS for the Analysis of Alzheimer's Amyloid Plaques, *Anal. Chem.* 70, 1026-1029.

Bionda, C., Athias, A., Poncet, D., Alphonse, G., Guezguez, A., Gambert, P., Claire Lafrasse, R., Ardail, D., 2008. Differential regulation of cell death in head and neck cell carcinoma through alteration of cholesterol levels in lipid rafts microdomains, *Biochem Pharmacol.* 75, 761- 772.

Bhadoria, M., 2012. Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats. *Food and Chem. Toxicol.* 10, 1016-1025.

Blanco V. G., 2003-2004. Na,K-ATPase structure. The University of Kansas Medical Center. Molecular and Integrative Physiology. Visit: www.kumc.edu/physiology/blanco.html

Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E.G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D.W., Bjorkhem, I., 2001. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 314, 45-48.

Boldyrev A. A., 2001. Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66, 821-831.

Bolla K. I., Briefel G., Spector D., Schwartz B. S., Wieler L., Herron J. & Gimenez L., 1992. Neurocognitive effects of aluminium. *Arch. Neurol.* 49, 1021-1026.

Bondy, S., 2010. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neurotoxicol.* 31(5), 575–581.

Borisova, T., Krisanova, N., Sivko, R., Borysov, A., 2010. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Intern.* 56, 466-478.

Caspers M. L., Kwaiser T. M., Grammas P., 1990. Control of [³H] ouabain binding to cerebromicrovascular (Na⁺/K⁺)-ATPase by metal ions and proteins. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1891-1895.

Caspers M. L., Kwaiser T. M., Dow M. J., Fu M. J., Grammas P., 1993. Control of the (Na⁺/K⁺)ATPase under normal and pathological conditions. *Mol. Chem. Neuropathol.* 19, 65-81.

Caspers M. L., Dow M. J., Fu M. J., Jacques P. S. & Kwaiser T. M., 1994. Aluminum-induced alterations in [3H] ouabain binding and ATP hydrolysis catalysed by the rat brain synaptosomal (Na⁺/K⁺)ATPase. *Mol. Chem. Neuropathol.* 22, 43-55.

Chakraborty, H., Sena, P., Sura, A., Uttara Chatterjee, U., Chakrabartia, S., 2003. Age-related oxidative inactivation of (Na⁺/K⁺)ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 38, 705-710.

Crapper D. R., Krishman S. S., Dalton A. J., 1973. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science.* 180, 511-513.

Cordeiro, J.M., Silva, V.S., Oliveira, C.R., Gonçalves, P.P., 2003. Aluminium-induced impairment of Ca modulatory action on GABA transport in brain cortex nerve terminals. *J. Inorg. Biochem.* 97, 132–142.

Cornelius F., 2001. Modulation of (Na⁺/K⁺)ATPase and (Na⁺/K⁺)ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics. *Biochemistry.* 40, 8842-8851.

Cuevas, J. 2007. Structure and Function of Membranes. The comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier Inc. 10, 1-7.

Dalskov, S.M., Immerdal, L., Niels-Christiansen, L.L, Hansen, G.H., Schousboe, A., Danielsen E.M., 2005. Lipid raft localization of GABBA receptor and Na⁺, K⁺-ATPase in discrete microdomain clusters in rat cerebellar granule cells. *Neurochem. Int.* 46, 489-499.

Doelken V., 1897. Über die wirkung der aluminum mit besonderer berucksichtigung der durch dal aluminum vurursachten laisionen in zentralnervensystem, *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmak.* 40, 98-120.

Dostanic-Larson I., Lorenz J. N., Van Huysse J. W., Neumann J. C., Moseley A. E., Lingrel J. B., 2006. Physiological role of the α_1 - and α_2 -isoforms of the Na⁺/K⁺-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 524–528.

Exley C., Korchazhkina O., 2001. The association of aluminum and β amyloid in Alzheimer's disease. In: Exley C. (Eds.) *Aluminium and Alzheimer's disease. The science that describes the link*, chapter 22, Elsevier Science, 421-433.

Exley C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380-387.

Exley C., 2009. Aluminium and Medicine. In; *Molecular and Supramolecular Bioinorganic Chemistry: Applications in Medical Sciences*. Nova Science Publishers Inc. New York, 45-68.

Fagan J. M., Slecicka B. N., Sohar I., 1999. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 751-757.

Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., D'Arcangelo, G., 2008. Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 212, 407-414.

Ganrot P. O., 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65, 363-441.

Geering K., 2006. FXYP proteins: new regulators of (Na⁺/K⁺)ATPase. *Am. J. Physiol. Renal* 290, 241-250.

Gimpl, G., Gehrig-Burger, K., 2011. Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids.* 76, 216-231.

Giraud F, Claret M, Garay RD., 1976. Interaction of cholesterol with the sodium pump in red blood cells. *Nature* 264, 646–649.

Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Rosa, M.M., Schmatz, R., Rodrigues, M., Vieira, J.M., Mazzanti, C.M., Morsch, V.M., Rubin, M.A., Schetinger, M.C., Spanevello, R.M., 2012. Protective effect of α -Tocopherol on memory deficits and (Na⁺/K⁺)ATPase and acetylcholinesterase activities in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Biomedic. Aging Pathol.* 2, 73-80.

Hajós F., 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.

Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Watayab, T., Perry, G., Mark A. Smith, M. A., Inagaki, C., 1998. Cl-ATPase and (Na⁺/K⁺)ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 254, 141-144.

Horisberger J. D., 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology.* 19, 377–387.

Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J.D., 2003. Structure and mechanism of (Na⁺/K⁺)ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 817-49.

Kairane, C., Rootsa, K., Uusma, T., Bogdanovicb, N., Karelsona, E., Köksc, S., Zilmer, M., 2002. Regulation of the frontocortical sodium pump by Na⁺ in Alzheimer's disease:

dilence from the age-matched control but similarity to the rat model. *FEBS Lett.* 531, 241-244.

Kaplan J. H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511-535.

Kaizer, R.R., Maldonado, P.A., Spanevello, R.M., Corrêia, M.C., Gonçalves, J.F., Becker, L.V., Morsch, V.M., 2007. The effect of aluminium on NTPDase and 50-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 81–386.

Kerr D. N. S., Ward M. K., 1988. In: Metal ions in biological systems. Sigel M. & Sigel A. Marcel Dekker (eds.). New York. 24, 218-251.

Kölsch, H., Heun, R., Jessen. F., Popp, J., Hentschel, F., Maier, W., Lütjohann, D., 2010. Alterations of cholesterol precursor levels in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 945-950.

Kühlbrandt, W., 2004. Biology, Structure and Mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 282-295.

Layne E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* 3, 447-451.

Ledesma, M.D., Dotti, C.G., 2006. Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for?. *FEBS Lett.* 580, 5525-5532.

Liu, L., Mohammadi, K., Aynafshar, B., Wang, H., Li, D., Liu, J., Ivanov, A.V., Xie, Z., Askari, A., 2003. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac (Na⁺/K⁺)ATPase. *Am J. Physiol. Cell* 284, 1550-1560.

Liang, M., Tian, J., Liu, L., Pierre, S., Liu, J., Shapiro, J., 2007. Identification of a pool of nonpumping (Na⁺/K⁺)ATPase. *J. Biol. Chem.* 282, 10585-93.

Lynch, C., Mobley, W., 2000. Comprehensive theory of Alzheimer's disease. The effects of cholesterol on membrane receptor trafficking. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 104-111.

Maxfield, F.R., Tabas, I., 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612–621.

Madeira V.M.C., Antunes-Madeira M.C., Carvalho A.P., 1974. Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 58, 897-904.

Mason, R. P., Tulenko, T. N., Jacob, R. F., 2003. Direct evidence for cholesterol crystalline domains in biological membranes: role in human pathobiology. *Biochim. Biophys.* 1610, 198-207.

Mathew, A., Yoshida, Y., Maekawa, T., D. Kumar, D.S., 2011. Alzheimer's disease: Cholesterol a menace?. *Brain Res. Bull.* 86, 1-12.

Mayol, V., Duran, M., Gerbi, A., Dignat-George, F., Lévy, S., Sampol, J., Maixente, J., 1999. Cholesterol and omega-3 fatty acids inhibit Na, K-ATPase activity in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 142, 327-333.

Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P., 1978. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem.* 24/12, 2161-5.

Moraes, P., 2007. O efeito do alumínio no crescimento e na actividade de (Na⁺/K⁺)ATPase da *Escherichia coli*. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro.

Nicholls D. G., 1989. Release of glutamate, aspartate, and aminobutyric acid from isolated nerves terminals. *J. Neurochem.* 52. 331-341.

Pandya, J.D., Dave, K. D., Katyare, S. S., 2004. Effect of long-term aluminum feeding on lipid/phospholipid profiles of rat brain myelin. *Lipids Health Dis.* 3, 1-13.

Polizzi, S., Pira, E., Ferrara, M., Bugiani, M., Papaleo, A., Albera, R., Palmi, S., 2002. Neurotoxic Effects of Aluminium Among. Foundry Workers and Alzheimer's Diseases. *Neurotoxicology.* 23, 761-774.

Quintas, L.E.M., Pierre, S.V., Liu, L., Bai, Y., Liu, X., Xie, Z., 2010. Alterations of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 525–531.

Taniguchi K., Kaya S., Abe K., Mardh S., 2001. The oligomeric nature of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. *J. Biochem.* 129, 335-342.

Toyoshima, H., Kanai, R., Flemming, C., 2011. First Crystal Structures of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$: New Light on the Oldest Ion Pump. *Structure.* 19, 1732-1738.

Rensburg S. J. V., Daniels W. M., Potocnik F. C., Zyl J. M. V., Taljaard J. J., Emsley R. A., 1997. A new model for the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aluminium toxicity is exacerbated by hydrogen peroxide and attenuated by an amyloid protein fragment and melatonin. *S. Afr. Med. J.* 87, 1111-1115.

Sarin, S., Gupta, V., Gill, K. D., 1997. Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biol. Trace Elem. Res.* 59, 133-143.

Savory J., Rao J. K. S., Huang Y., Letada P. R., Herman M. M., 1999. Age-related hippocampal changes in Bcl-2: Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum induced neurodegeneration: Increased susceptibility with aging. *Neurotoxicology.* 20, 805-817.

Sethi, P., Jyoti. A., Singh, R., Hussain, A.S., 2008. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology.* 29, 1069-1079.

Sjögren, M., Mielke, M., Deborah Gustafson, D., Zandi, P., Skoog, I., 2006. Cholesterol and Alzheimer's disease - is there a relation?. *Mech Ageing Dev.* 127, 138-147.

Skou J. C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401.

Skou J. C., 1965. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45, 596-617.

Silva, V.S., Cordeiro, J.M. Matos, M.J., Oliveira, C.R., Gonçalves P.P., 2002. Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol. *Neurosci. Res.* 44, 181-193.

Silva, V.S., Duarte, A.I., Rego, A.C., Oliveira, C.R., Gonçalves, P.P., 2005. Effect of Chronic Exposure to Aluminium on Isoform Expression and Activity of Rat (Na^+/K^+)ATPase. *Toxicol. Sci.* 88(2), 485-494.

Silva, V.S., Gonçalves, P.P., 2003. The inhibitory effect of aluminium on the (Na^+/K^+)ATPase activity of rat brain cortex synaptosomes. *J. Inorg. Biochem.* 97, 143-150.

Trevisi, L., Pighin, I., Bazzan, S., Luciani, S., 2006. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 580, 2769-2773.

Xie, Z., Askari, A., 2002. (Na^+/K^+)ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 269, 2434-2439.

Wang, H., Hass, M., Liang, M., Cai, T., Tian, J., Li, S., 2004. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar (Na^+/K^+)ATPase. *J Biol Chem.* 279, 17250-9.

Yatime, L., Laursen, M., Morth, L.P., Esmann, M., Nissen, P., Fedosova, N.U., 2011. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the (Na^+/K^+)ATPase. *J. Struct. Biol.* 174, 296-306.

Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology.* 21, 813-828.

Yokel R. A., McNamara P. J., 2001. Aluminium toxicokinetics: An updated minireview. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 159-167.

Yu S. P., 2003. (Na⁺/K⁺)ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601-1609.