

Ácido Quinolínico desestabiliza o citoesqueleto de neurônios estriatais em cultura: papel protetor dos astrócitos.

Bárbara Lima, Regina Pessoa-Pureur.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

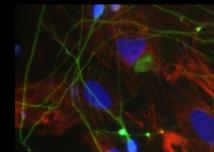
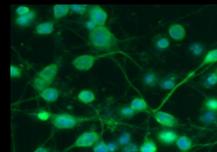
INTRODUÇÃO

O ácido quinolínico (QUIN) é um agonista N-metil-D-aspartato (NMDA) que está implicado em várias doenças neurodegenerativas, e mimetiza algumas alterações moleculares observadas na doença de Huntington (DH), como a perda de neurônios estriatais específicos. Como consequência, muitos estudos têm se centrado na excitotoxicidade induzida pelo QUIN nesta condição.

Os neurofilamentos (NF) são regulados por fosforilação das suas subunidades, que por sua vez é regulada por padrões complexos de sinalização celular, incluindo a interação com as células da glia.

MÉTODOS

Cultura primária de neurônios estriatais



Co-cultura primária de neurônios/astrocitos

QUIN 1, 10, 25 e 100 μ M e/ou 50 μ M DL-AP5 por 24 h

Viabilidade celular

Citometria de fluxo

Morfologia celular

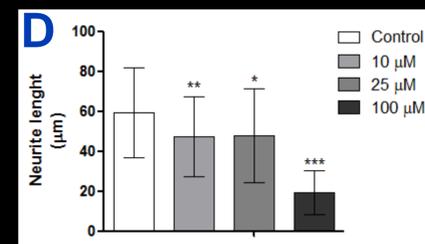
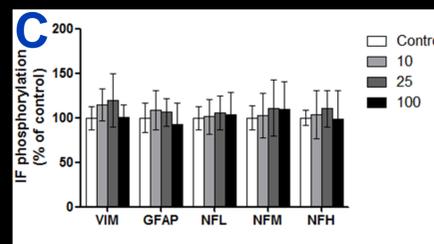
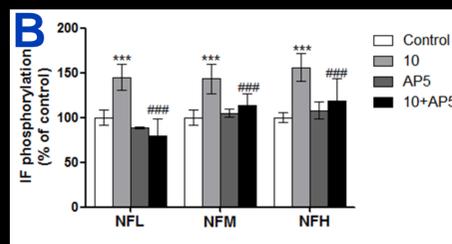
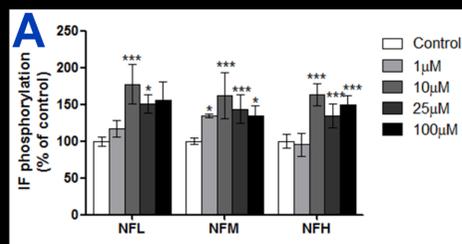
Imunocitofluorescência

Fosforilação dos neurofilamentos

OBJETIVOS

O objetivo do estudo é analisar o papel dos receptores NMDA na fosforilação das subunidades de baixo (NFL), médio (NFM) e alto peso molecular (NFH) em cultura de neurônios estriatais expostos a concentrações crescentes de QUIN durante 24 h. Além disso, verificar as alterações morfológicas causadas pelo QUIN e um provável papel de proteção dos astrócitos nestes efeitos.

RESULTADOS



Controle

10 μ M

25 μ M

100 μ M

50% de células apoptóticas

E

β -III
Tubulin/
DAPI

MAP2/
DAPI

Figura. Efeito do tratamento com QUIN sobre os neurônios estriatais (A) Fosforilação dos NFs de neurônios estriatais com 1, 10, 25 e 100 μ M de QUIN por 24 h; (B) DL-AP5 e QUIN, 50 and 10 μ M, respectivamente; (C) Fosforilação dos IF nas co-culturas tratadas com 10, 25 and 100 μ M de QUIN; Culturas celulares foram pré-incubadas com QUIN por 24 h e incubadas com QUIN na presença de 32 P-ortofosfato por 1 h. A fração citoesquelética insolúvel no tampão de alta força iônica foi extraída e a radioatividade incorporada nos Fis foi medida. Dados densitométricos estão mostrados. Dados reportados como média \pm D.P. expressos como porcentagem do controle. (D) Análise morfométrica do comprimento dos neuritos tratados com QUIN. O comprimento dos neuritos de cada célula marcada com β -III tubulina e MAP2 foram analisadas usando Image J Software. (E) Imagens representativas dos neurônios marcados com anti- β -III tubulina (verde) e anti-MAP2 (vermelho) e DAPI (azul), mostrando que o tratamento altera a extensão dos neuritos. Escala da Barra: 40X (30 μ m). Diferenças estatisticamente significativas dos controles, como determinado por ANOVA de uma via seguido de teste de comparação múltipla como indicado: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Diferença estatisticamente significativa do tratado estão indicados: ### p <0,001.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o QUIN causou hiperfosforilação dos NFs estudados e estes efeitos foram mediados por receptor NMDA, reforçando a importância dos mecanismos glutamatérgicos no dano ao SNC causado pelo QUIN. Além disso, houve uma proteção destes efeitos quando os neurônios foram tratados em co-cultura, reforçando o papel dos astrócitos na proteção aos neurônios em uma injúria cerebral.