

# EVIDÊNCIA DE QUE O ÁCIDO 3-METILGLUTÁRICO INIBE A ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase VIA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM SINAPTOSSOMAS DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS

Fernanda H. Hickmann<sup>1</sup>, César Augusto João Ribeiro<sup>1</sup>, Moacir Wajner<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS. <sup>2</sup>Serviço de Genética, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS  
fernanda.hickmann@hotmail.com

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Concentrações aumentadas de ácido 3-metilglutárico (MGA) são observadas em um grupo de doenças conhecidas como acidúria 3-metilglutacônica bem como na acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica. Apesar dos pacientes acometidos por essas doenças apresentarem sintomas neurológicos, os mecanismos envolvidos no dano cerebral são pouco conhecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos *in vitro* do MGA sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, uma enzima fundamental para o funcionamento do sistema nervoso central, em sinaptossomas isolados de córtex cerebral de ratos jovens.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais e reagentes:** ratos Wistar machos de 30 dias de vida foram utilizados nos experimentos. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.

**Preparo e incubação dos sinaptossomas:** Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro rapidamente removido, o córtex cerebral isolado e homogeneizado para a preparação dos sinaptossomas de acordo com Springer e colaboradores (*Brain Res Protocol*, 2, 1998). A integridade/viabilidade sinaptossomal foi avaliada através da medida da liberação da enzima lactato desidrogenase. As preparações sinaptossomais foram incubadas durante 1 hora a 37°C na presença de concentrações variadas de MGA (0,1-5mM). Os grupos controle não continham o metabólito no meio de incubação. Após a incubação os sinaptossomas foram coletados e utilizados para as determinações bioquímicas.

**Formação de espécies reativas de oxigênio:** A formação de espécies reativas de oxigênio foi determinada de acordo com Silva-Adaya e colaboradores (*J Neurochem*, 105(3), 2008) através da medida da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA).

**Atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase:** A atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi determinada de acordo com Tsakiris e Deliconstantinos (*Biochem J*, 220, 1984), e a dosagem de fosfato inorgânico de acordo com o método de Chan e colaboradores (*Anal Biochem*, 157, 1986).

## RESULTADOS

A figura 1 demonstra que o MGA nas concentrações testadas (0,1-5,0mM) não altera a liberação da lactato desidrogenase, sugerindo que o metabólito não modifica a integridade dos sinaptossomas. Entretanto, o MGA aumentou significativamente (30%) a oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), o que demonstra uma indução de produção de espécies reativas (Figura 2). O MGA também inibiu significativamente a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (30%, Figura 3). Além disso, o efeito inibitório causado pelo MGA na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi totalmente prevenido quando em co-incubação com os antioxidantes creatina e melatonina (Figura 4).

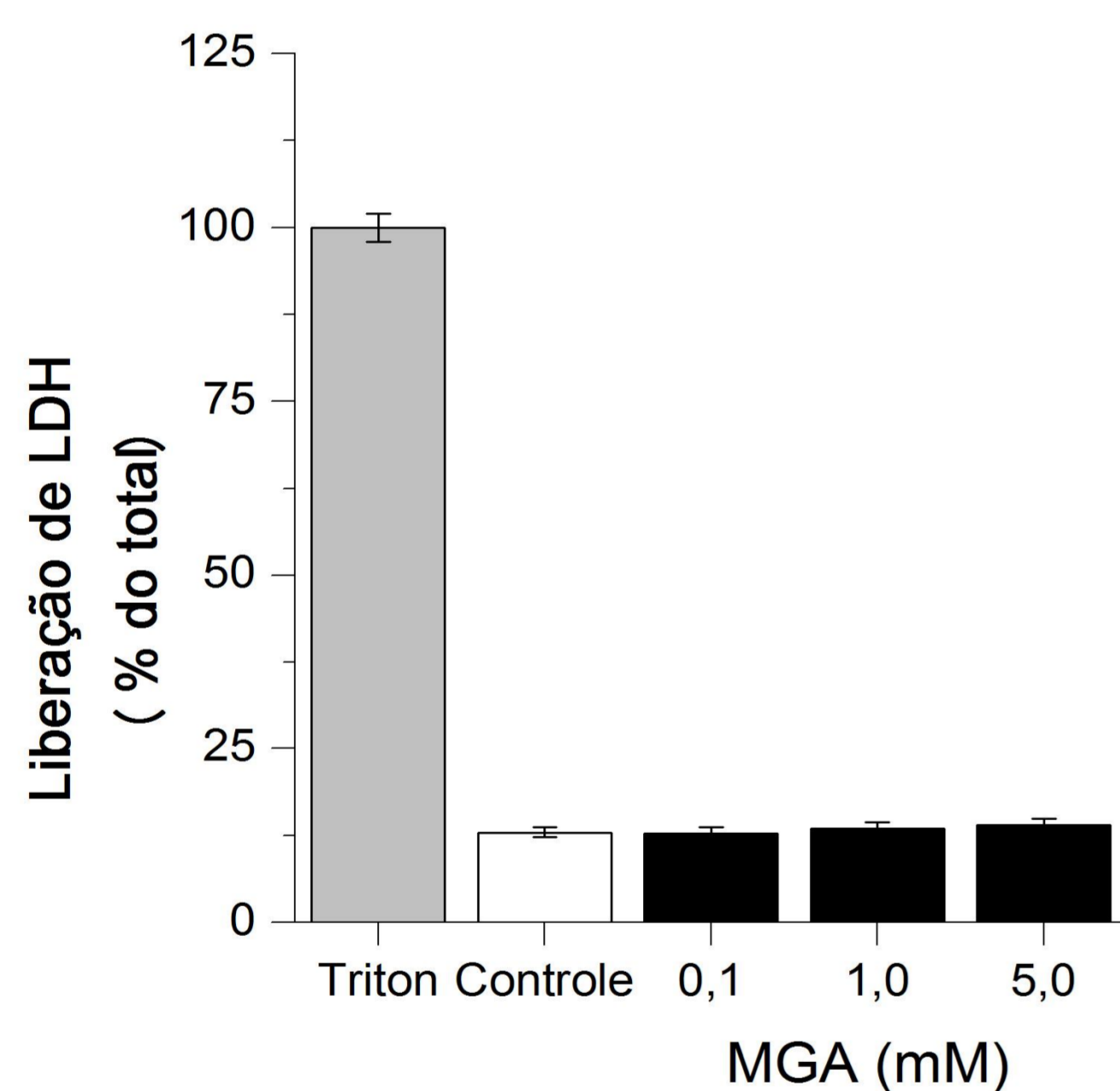


Figura 1: Efeito do ácido 3-metilglutárico (MGA) sobre a liberação da lactato desidrogenase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos jovens. Para a liberação total (100%), preparações sinaptossomais foram incubadas na presença de Triton X-100 0,1%. Os dados são expressos em média ± EPM em 6 experimentos independentes realizados em triplicata e são expressos em percentual da liberação total. Não foram observadas diferenças entre os grupos (ANOVA de uma via).

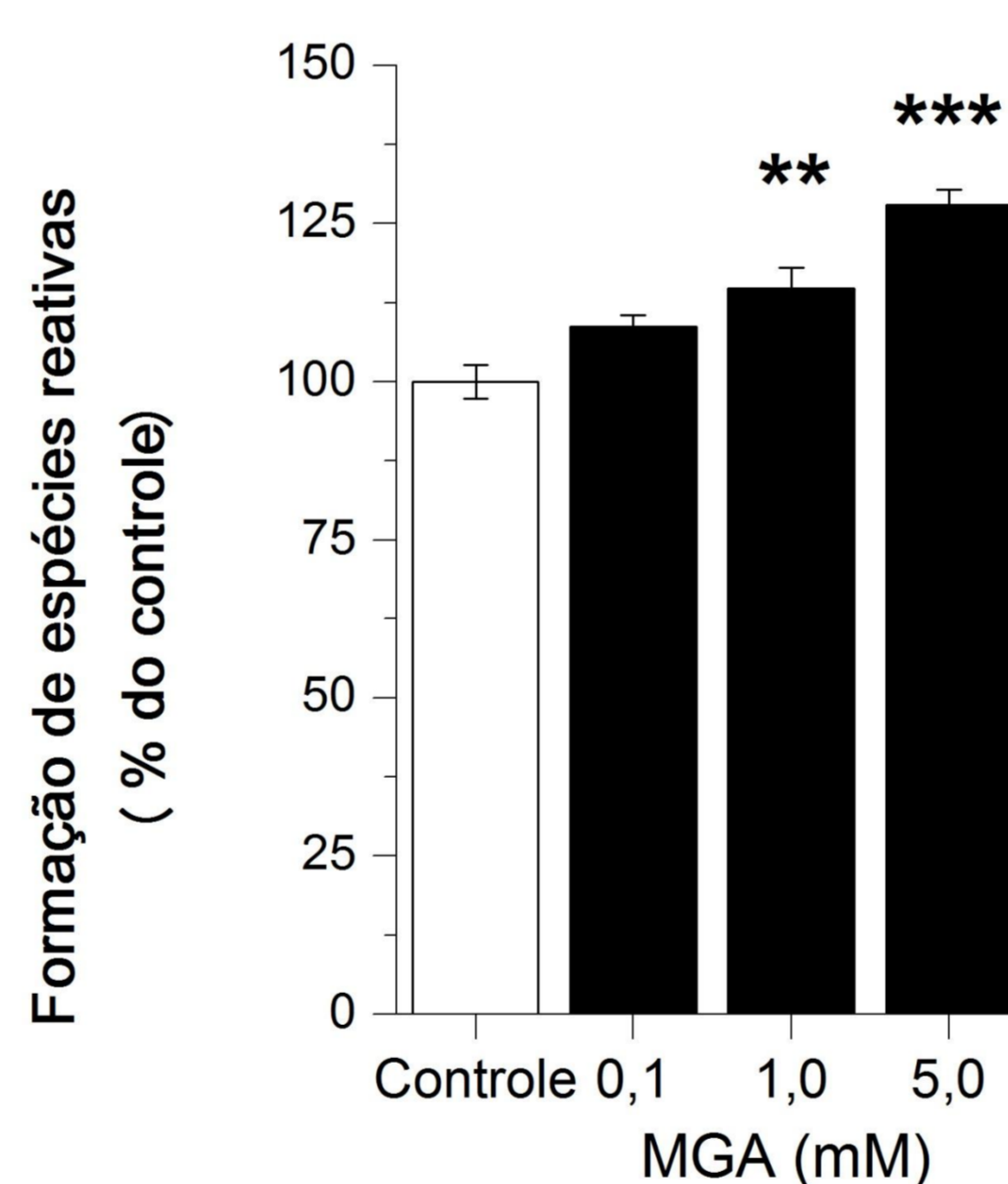


Figura 2: Efeito do ácido 3-metilglutárico (MGA) sobre a formação de espécies reativas em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos jovens. Preparações sinaptossomais foram incubadas em 37°C por 60 minutos na presença de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) diacetato na ausência (controle) ou presença de diversas concentrações de MGA. A fluorescência basal do corante foi determinada na ausência de preparações sinaptossomais. Os dados são expressos em percentual do controle e são representados como média ± EPM (n= 7). \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle. (ANOVA seguida de teste de Duncan).

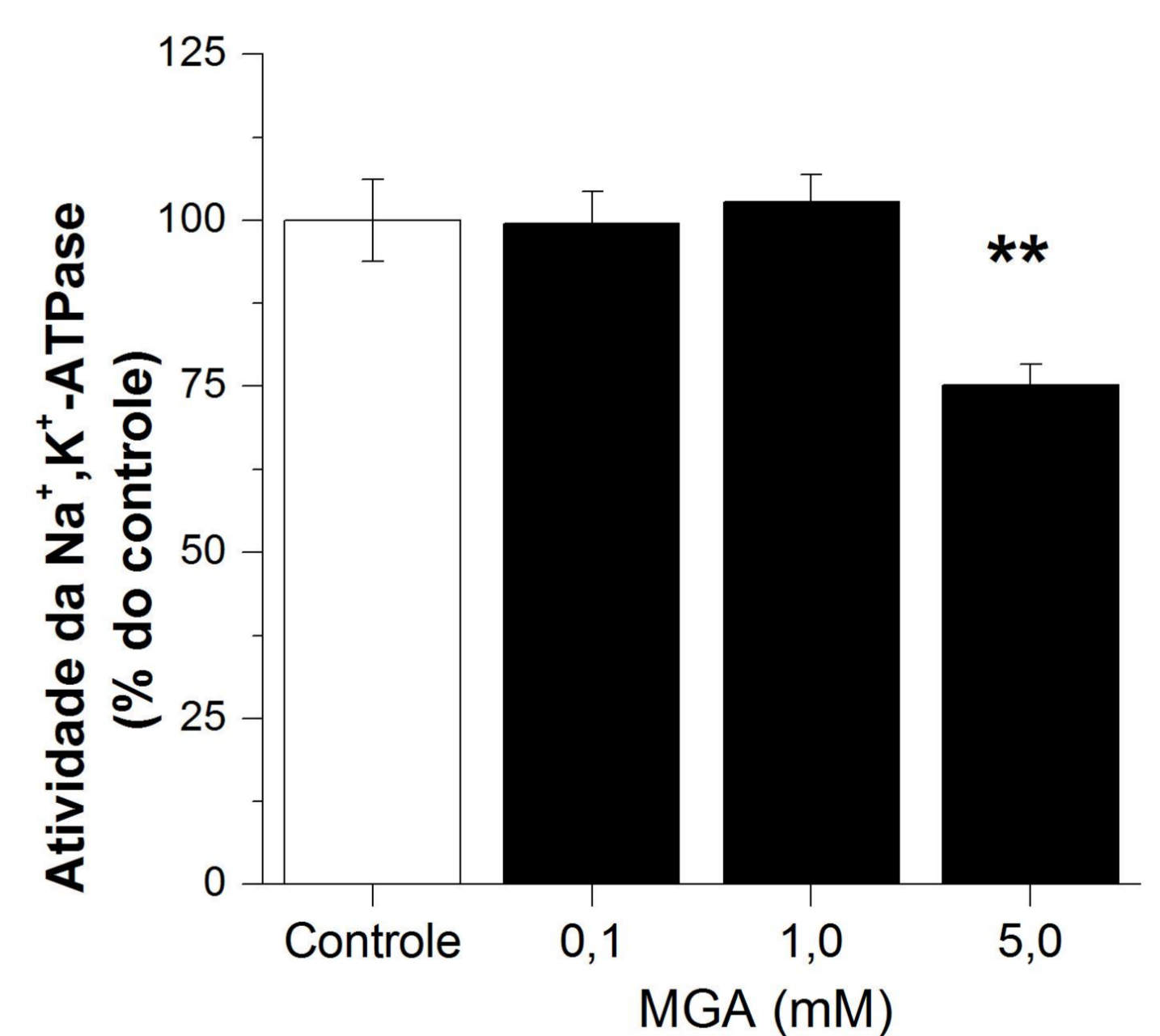


Figura 3: Efeito do ácido 3-metilglutárico (MGA) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos jovens. Preparações sinaptossomais foram incubadas em 37°C por 60 minutos na ausência (controle) ou presença do MGA. Os dados são expressos em percentual do controle e são representados como média ± EPM (n= 5-9). \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle. (ANOVA seguida de teste de Duncan)

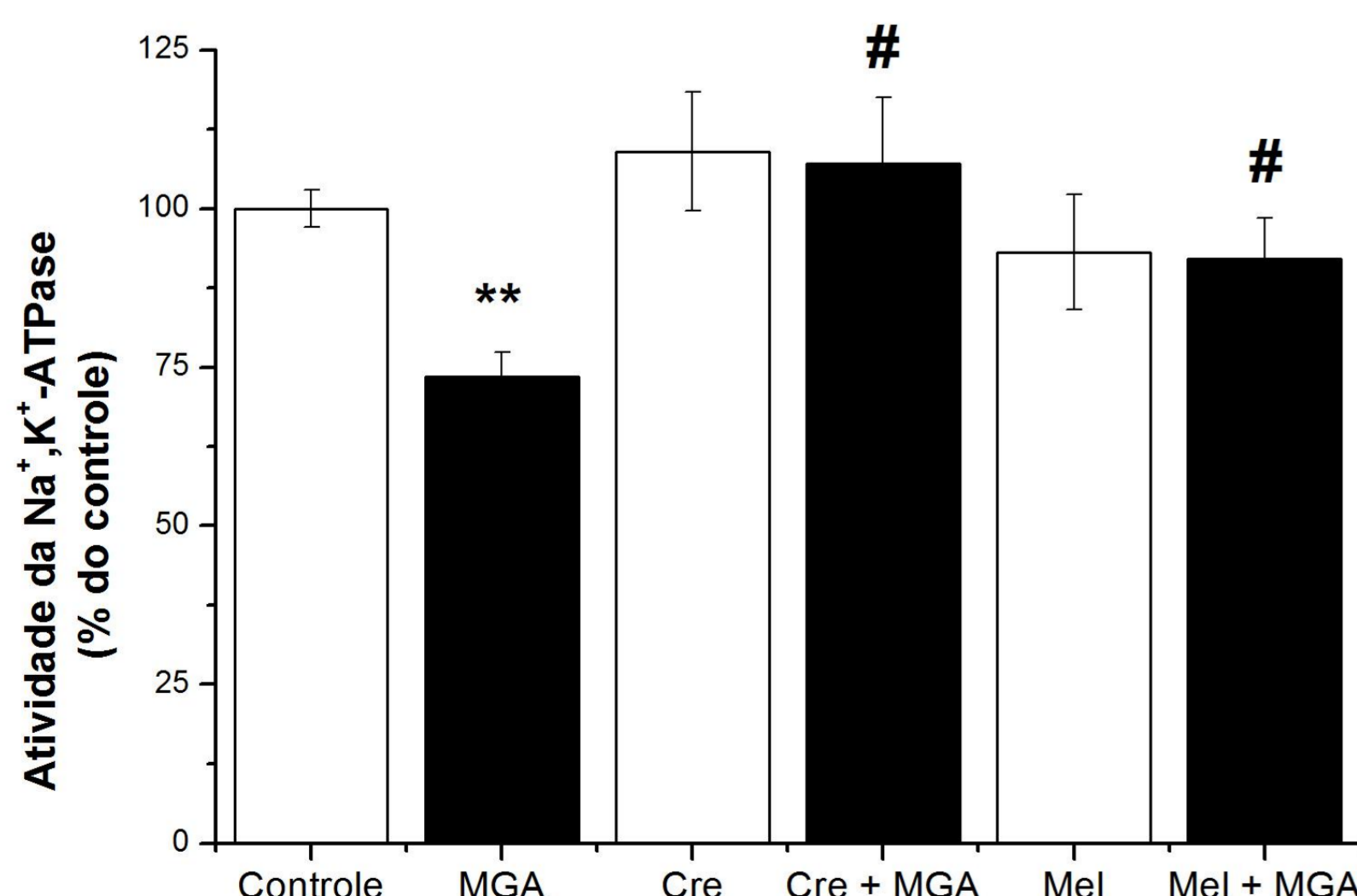


Figura 4: Efeitos da creatina (Cre, 1mM) e melatonina (Mel, 0,1mM) sobre a inibição na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase causada pelo MGA em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos jovens. Preparações sinaptossomais foram co-incubadas em 37°C por 60 minutos na presença ou na ausência de Cre ou Mel com 5mM de MGA. Os dados são expressos em percentual do controle e são representados como média ± EPM (n= 5). \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle, #P<0,01 comparado com o grupo MGA (ANOVA seguida de teste de Duncan).

## CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho indicam que o MGA reduz a atividade de uma importante enzima para a manutenção do potencial de membrana e, ainda, induz o aumento da produção de espécies reativas. Além disso, observamos que a co-incubação de MGA com os antioxidantes creatina e melatonina preveniu completamente o efeito inibitório do metabólito sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, sugerindo o envolvimento de espécies reativas neste efeito inibitório. Sendo assim, é presumível que estes efeitos estejam envolvidos na fisiopatologia do dano cerebral apresentado pelos pacientes afetados por doenças em que há o acúmulo de MGA.

Apoio financeiro: CNPq, PROPESQ/UFRGS, INCT-EN, FINEP (Rede Instituto Brasileiro de Neurociência s(IBM-Net) nº 01.06.0842-00).