

EVIDÊNCIA NEUROQUÍMICA DE QUE A GLICINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO EM CEREBELO DE RATOS JOVENS



Bumbel, A.P.¹, Moura, A.P.¹, Grings, M.¹, Marcowich, G.F.¹, Alvorcem, L.M.¹, Parmeggiani, B.¹, Wajner, M.^{1,2}, Leipnitz, G.¹

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS –RS, Brazil.

²Serviço de Genética Médica, HCPA–RS, Brazil.



Introdução

A hiperglicemia não-cetótica (HNC) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva causado por um defeito no sistema de clivagem da glicina (GLI), levando ao acúmulo desse aminoácido nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. O quadro clínico é caracterizado por espasmos, apneia, retardo mental, leucoencefalopatia e convulsões graves que podem levar à morte do paciente. Além disso, os indivíduos afetados também apresentam frequentemente atrofia e degeneração cerebelares.

Objetivo

Considerando que a fisiopatogenia do dano cerebelar encontrado em pacientes com HNC ainda não está esclarecida, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* da GLI sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em cerebelo de ratos jovens.

Material e Métodos

Ratos Wistar de 30 dias de idade foram utilizados no presente estudo. Os animais foram mortos por decapitação, o cerebelo foi isolado e homogeneizado em tampão específico de cada técnica. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: oxidação de 2',7'-dichlorofluorescina (DCFH) [1], produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [2], níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) [3], concentrações de glutatona (GSH) [4], formação de carbonilas [5], conteúdo de sulfidrilas [6] e atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) [7] e superóxido dismutase (SOD) [8]. Também foram determinados os seguintes parâmetros de metabolismo energético: atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (I-III, II-III e IV) [9,10,11] e da enzima creatina quinase (CK) [12].

Resultados

Nossos resultados demonstram que a GLI aumentou significativamente a oxidação de DCFH (Fig. 1A) e os níveis de TBA-RS (Fig. 2A) em cerebelo de ratos, indicando que esse aminoácido induz oxidação lipídica a partir do aumento na produção de espécies reativas. A GLI também reduziu as concentrações de GSH (Fig. 3A), comprometendo as defesas antioxidantes não enzimáticas no cerebelo. Os antioxidantes melatonina (MEL) e trolox (TRO; análogo hidrossolúvel do α -tocoferol) preveniram o aumento das TBA-RS (Fig. 2B) e a diminuição do conteúdo de GSH (Fig. 3B) induzidos pela GLI, reforçando que os efeitos pró-oxidantes da GLI são mediados por espécies reativas. No entanto, a GLI não alterou produção mitocondrial de H₂O₂ (Fig. 1B), a formação de carbonilas, o conteúdo de sulfidrilas e as atividades da CAT e da SOD (Tabela 2). Além disso, a GLI não modificou as atividades dos complexos da CTE e da CK (Tabela 1).

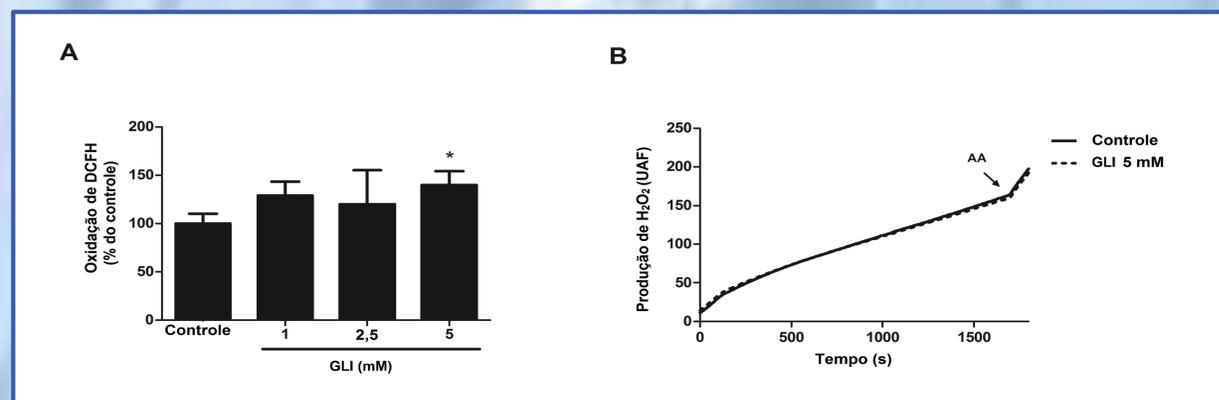


Fig.1 Efeito da glicina (GLI) sobre a oxidação da 2',7'-dichlorofluorescina (DCFH) (A) e sobre a produção de peróxido de hidrogênio (B) em cerebelo de ratos. Fatias de cerebelo foram incubadas na presença de GLI (1-5 mM) e a oxidação de DCFH foi medida em seguida. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão de quatro a cinco experimentos independentes (animais) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: oxidação da DCFH [pmol.g de tecido⁻¹]: 275 \pm 27,7). * $P < 0,05$, comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan) (A). Para os experimentos de medida da produção de peróxido de hidrogênio, preparações mitocondriais de cerebelo (0,5 mg protein.mL⁻¹), 2,5 mM de glutamato e 2,5 mM de malato (substratos), e 5 mM de GLI foram adicionados ao meio de incubação no início do ensaio. Antimicina A (AA) (0,1 μ g.mL⁻¹) foi adicionada no final dos ensaios, como indicado na figura. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) (B). Para A e B, o grupo controle não continha a GLI no meio de incubação.

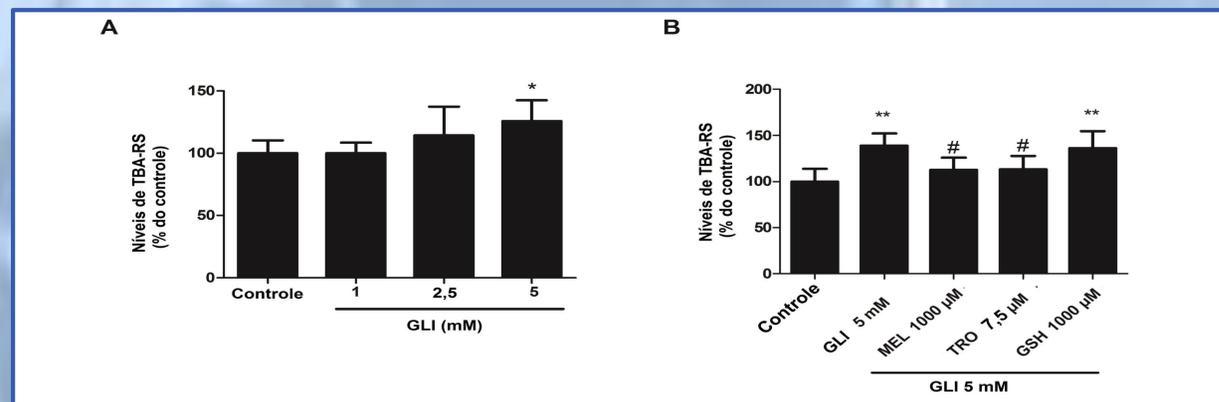


Fig.2 Efeito da glicina (GLI) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cerebelo de ratos (A). Em alguns experimentos, os sobrenadantes de cerebelo foram incubados na presença de GLI (5 mM) e melatonina (MEL, 1000 μ M), trolox (TRO, 7,5 μ M) ou glutatona (GSH, 1000 μ M) (B). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão de quatro a seis experimentos independentes (animais) e estão expressos como porcentagem dos controles (Controles: TBA-RS [nmol.mg proteína⁻¹]: (A) 0,12 \pm 0,01; (B) 1,52 \pm 0,20). Os grupos controle não continham os compostos testados no meio de incubação. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ em comparação com os controles, # $P < 0,05$, comparado a GLY 5,0 mM (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

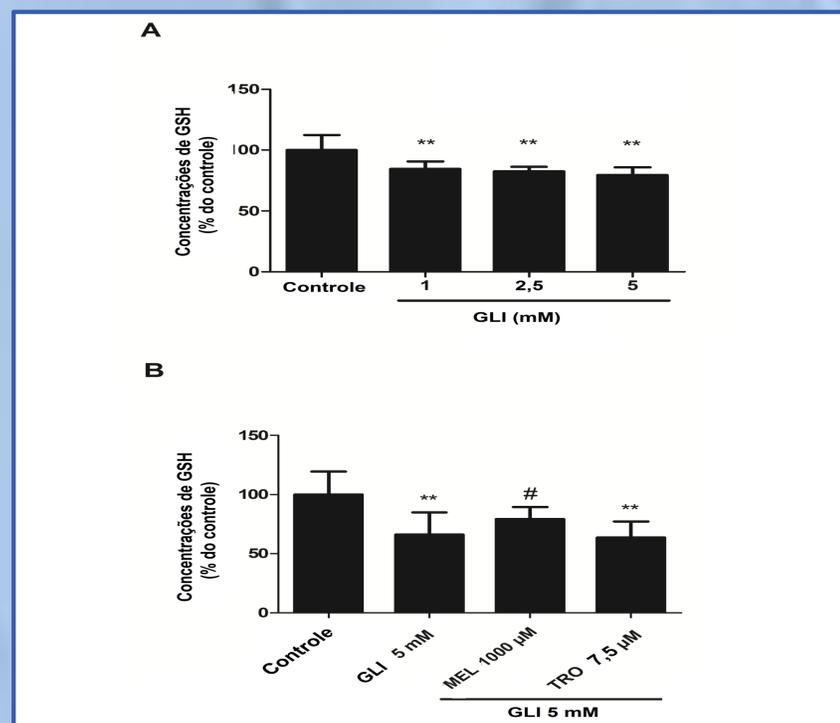


Fig.3 Efeito da glicina (GLI) sobre as concentrações de glutatona (GSH) em cerebelo de ratos (A). Em alguns experimentos, os sobrenadantes de cerebelo foram incubados na presença de GLI (5 mM) e melatonina (MEL, 1000 μ M) ou trolox (TRO, 7,5 μ M) (B). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes (animais) e estão expressos como porcentagem do controle (Controles: concentrações de GSH [nmol.mg proteína⁻¹]: (A) 12,2 \pm 1,54; (B) 15,4 \pm 5,18). Os grupos controle não continham os compostos testados no meio de incubação. ** $P < 0,01$, comparado aos controles; # $P < 0,05$, comparado a GLI 5 mM (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Tabela 2. Efeitos da glicina (GLI) sobre a formação de grupamentos carbonila e atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em cerebelo de ratos.

	Dano oxidativo a proteínas			
	Controle	1 mM	2,5 mM	5 mM
Formação de grupamentos carbonila	100 \pm 19,5	94,0 \pm 27,4	104 \pm 23,6	96,0 \pm 18,1
Conteúdo total de sulfidrilas	100 \pm 4,14	93,0 \pm 7,41	102 \pm 2,73	95,0 \pm 5,50
Atividade das enzimas antioxidantes				
	Controle	1 mM	2,5 mM	5 mM
Catalase (CAT)	100 \pm 9,12	89,0 \pm 14,2	93,0 \pm 13,2	94,0 \pm 13,7
Superóxido Dismutase (SOD)	100 \pm 8,05	100 \pm 2,53	101 \pm 2,59	100 \pm 4,29

Os valores estão representados como média \pm desvio padrão de quatro a seis experimentos independentes (animais) e estão expressos como porcentagem do controle (Formação de carbonilas [nmol.mg proteína⁻¹]: Controle: 2,03 \pm 0,40; Conteúdo total de sulfidrilas [nmol.mg proteína⁻¹]: Controle: 32,2 \pm 2,52; Atividade da CAT [U.mg proteína⁻¹]: Controle: 4,10 \pm 0,37; Atividade da SOD [U.mg proteína⁻¹]: Controle: 6,40 \pm 0,52). Os grupos controle não continham o composto testado no meio de incubação. Nenhuma diferença significativa entre grupos foi observada (ANOVA de uma via).

Tabela 1. Efeitos da glicina (GLI) sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da enzima creatina cinase (CK) em cerebelo de ratos.

	Controle	1 mM	2,5 mM	5 mM
CI-III	100 \pm 27,5	103 \pm 55,6	115 \pm 55,6	109 \pm 40,5
CII	100 \pm 7,70	102 \pm 30,7	101 \pm 27,0	101 \pm 12,5
CII-III	100 \pm 14,2	104 \pm 20,8	99,0 \pm 13,8	100 \pm 14,2
CIV	100 \pm 9,50	97,0 \pm 18,5	89,0 \pm 14,3	88,0 \pm 16,5
CK	100 \pm 15,0	103 \pm 6,80	93,0 \pm 14,8	87,0 \pm 4,80

Os valores estão representados como média \pm desvio padrão de quatro a seis experimentos independentes (animais) e estão expressos como porcentagem do controle (atividade dos complexos: CI-III [nmol citocromo c reduzido.min⁻¹.mg proteína⁻¹]: Controle: 4,77 \pm 1,31; CII [nmol DCIP reduzido.min⁻¹.mg proteína⁻¹]: Controle: 5,82 \pm 0,39; CII-III [nmol citocromo c reduzido.min⁻¹.mg proteína⁻¹]: Controle: 8,47 \pm 1,19; CIV [nmol citocromo c oxidado.min⁻¹.mg proteína⁻¹]: Controle: 81,8 \pm 7,80; CK [nmol creatina.min⁻¹.mg proteína⁻¹]: Controle: 1,57 \pm 0,24). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de uma via).

Conclusão

Considerando que o presente estudo mostra que a GLI aumenta a produção de espécies reativas, induz peroxidação lipídica e diminui as concentrações de GSH em cerebelo de ratos *in vitro*, os nossos dados indicam que este aminoácido induz o estresse oxidativo nesta região cerebral. Portanto, pode ser presumido que esse patomecanismo contribua, pelo menos em parte, para a disfunção cerebelar encontrado na HNC.

Referências

^[1]LeBel CP. *Chem Res Toxicol* 1992, 347-52; ^[2]Mohanty JG et al. *J Immunol Methods* 1997, 202:133-41; ^[3]Esterbauer H, Cheeseman KH. *Methods Enzymol* 1990, 186:407-21; ^[4]Browne RW, Armstrong D. *Method Mol Cell Biol* 1998, 108:347-52; ^[5]Reznick AZ, Packer L. *Methods Enzymol* 1994, 233: 357-363; ^[6]Aksenov MY, Markesbery WR. *Neurosci Lett* 2001, 302:141-5; ^[7]Aebi H. *Methods Enzymol* 1984, 105:121-6; ^[8]Marklund SL. *Handbook for oxygen radical research*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985, 243-7; ^[9]Schapiro AH, *J Neurochem* 1990, 55: 2142-2145; ^[10]Fischer JC et al. *Clin Chim Acta* 1985, 153(1): 23-26; ^[11]Rustin P et al. *Clin Chim Acta* 1994, 228(1): 35-51; ^[12]Hughes BP et al. *Clin Chim Acta* 1962, 7: 597-603.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, PRONEX, FINEP, FAPERGS, Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).