

# Estresse oxidativo e vias de sinalização alteradas em camundongos nocautes para a glutaril-coa desidrogenase: implicações sobre a toxicidade do ácido quinolínico na neuropatologia da acidemia glutárica tipo I

Ribeiro, R.T.<sup>1</sup>, Wajner, M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre – RS, Brazil;

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre – RS, Brazil.

## Introdução

Acidemia glutárica tipo I (AG I) é uma doença neurometabólica causada pela deficiência da atividade da enzima glutaril-Coa desidrogenase (GCDH), levando ao acúmulo dos ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxi glutárico nos tecidos, especialmente no cérebro. Os pacientes são acometidos por crises encefalopáticas agudas acompanhadas de degeneração dos gânglios da base, bem como leucoencefalopatia cortical progressiva. Neste contexto, a via das quinureninas é estimulada por citocinas inflamatórias, resultando na produção de ácido quinolínico (QUIN).

## Objetivos

Nosso objetivo foi investigar o efeito de uma dieta rica em lisina associada à injeção de QUIN sobre a homeostase redox celular e importantes vias de sinalização em estriado de camundongos nocaute para GCDH (modelo de AG I, *Gcdh*<sup>-/-</sup>) uma vez que a fisiopatogenia da lesão cerebral, particularmente a degeneração estriatal, na AG I ainda é pouco conhecida.

## Materiais e Métodos

Foram avaliados os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) [1], o conteúdo de grupamentos sulfidrilas [2], conteúdo de nitratos e nitritos [3], bem como as atividades de enzimas antioxidantes glutatona peroxidase [4], superóxido dismutase 2 [5] e glutatona-S transferase [6]. Além disso, foram avaliadas a oxidação do DCFH [7], concentrações de glutatona reduzida (GSH) [8] e o imunocônto de Nrf2, Keap1, NF-κB, IκBα, fosfo-Erk 1/2 e Akt, em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>-/-</sup> e em camundongos selvagem (*Gcdh*<sup>+/+</sup>) de 30 dias de vida, submetidos a uma dieta rica em Lis (4,7%) durante 48 horas e seguido de uma injeção intraestriatal de QUIN (50 nmol). Os animais foram mortos 24 horas após a injeção QUIN.

## Resultados e Discussão

Observamos que a administração de QUIN induziu dano oxidativo lipídico (TBA-RS - figura 1) e proteico (conteúdo de grupamentos sulfidrilas - figura 2), aumentou a geração de espécies reativas de nitrogênio (conteúdo de nitratos e nitritos - figura 3) e as atividades das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx - figura 4A), superóxido dismutase 2 (SOD2 - figura 4B) e glutatona-S transferase (GST - figura 4C) em animais *Gcdh*<sup>-/-</sup> e *Gcdh*<sup>+/+</sup>. Além disso, o QUIN induziu a oxidação da 2,2'-diclorofluoresceína (DCFH - produção de espécies reativas - figura 5) e reduziu as concentrações de GSH (defesa antioxidante não enzimática - figura 6) no estriado dos camundongos *Gcdh*<sup>-/-</sup>. No que diz respeito às vias de sinalização, verificou-se que a administração de QUIN no estriado dos animais *Gcdh*<sup>-/-</sup> provocou um aumento inicial de Nrf2 no núcleo (figura 7A) e de Akt (figura 7C) e fosfo-Erk 1/2 (figura 7D) no citosol, bem como uma diminuição citosólica de Keap1 (figura 7B), indicando a ativação da via do Nrf2 mediada por AKT e fosfo-Erk 1/2, possivelmente atuando como um mecanismo de compensação e proteção contra a toxicidade induzida por QUIN. Finalmente, o QUIN aumentou a expressão de NF-κB (Figura 8A e 8B) e diminuiu a de IκBα (8C) em *Gcdh*<sup>-/-</sup>, indicando o início de uma resposta inflamatória provocada por esse metabólito no estriado dos camundongos.

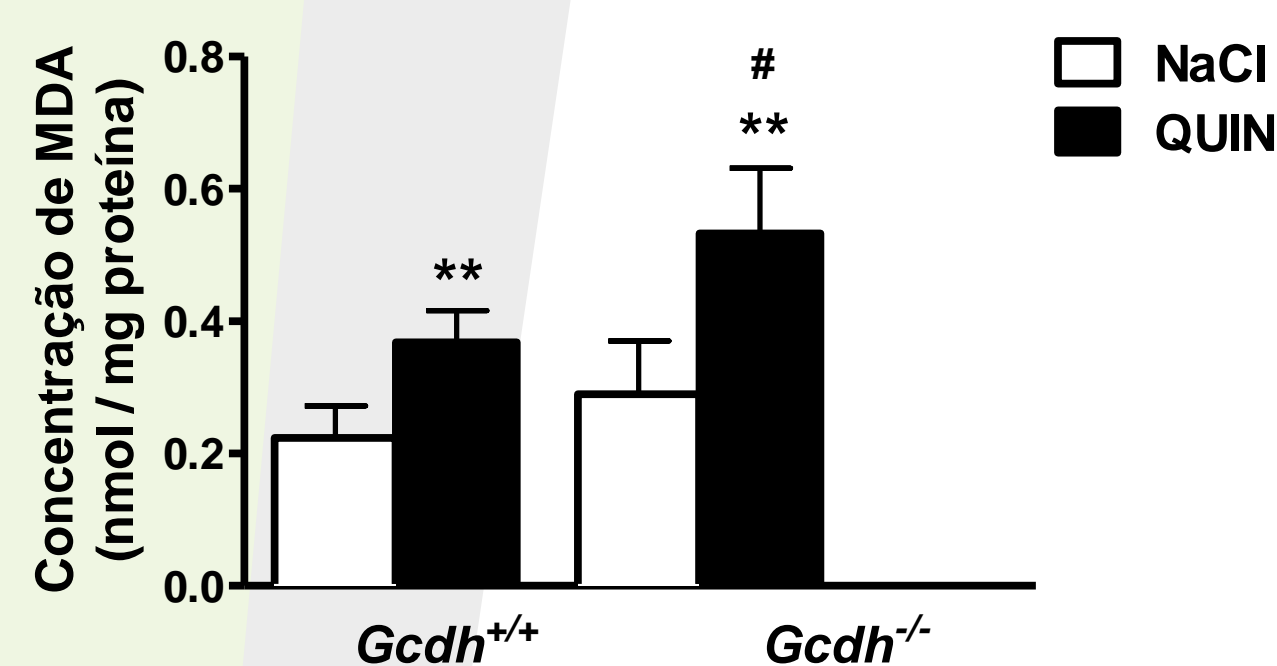


Fig 1. Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) expressas em concentração de malondialdeído em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \*\* P < 0,01 comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl, # P < 0,05 comparado com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetados com QUIN (teste t de Student para amostras não pareadas).

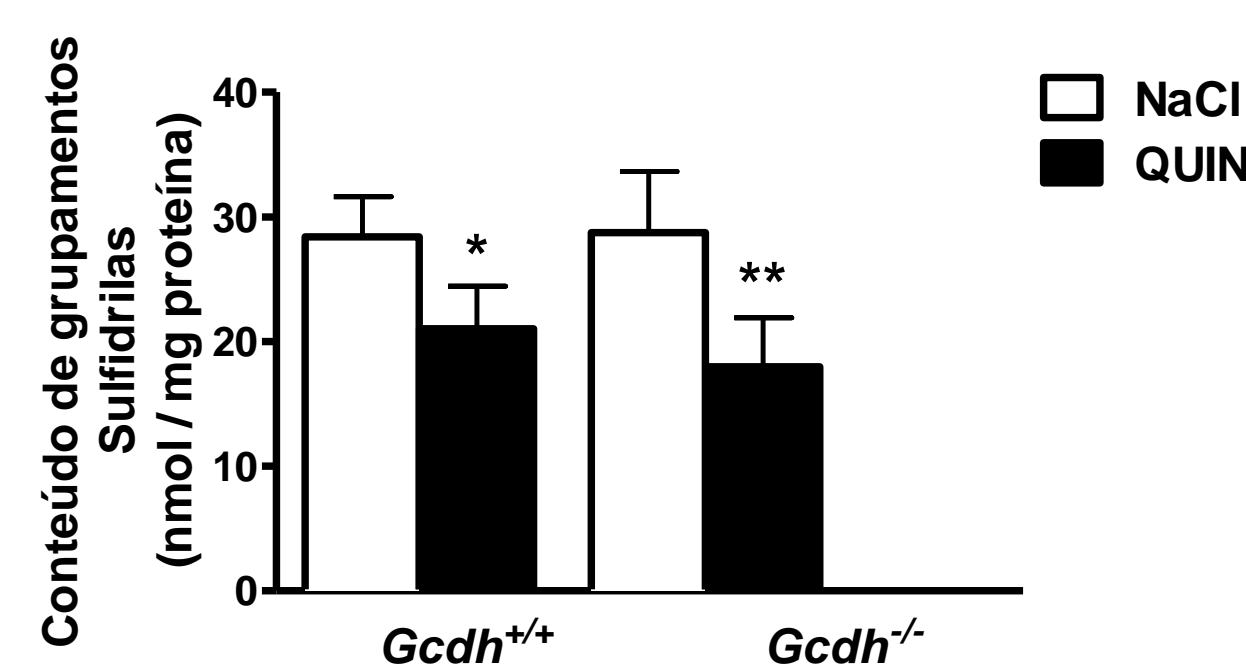


Fig 2. Conteúdo de grupamentos sulfidrilas em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). A oxidação de tióis foi medida 24 h após uma única injeção intraestriatal de NaCl ou QUIN (50 nmol). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \*\* P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl (teste t de Student para amostras não pareadas).

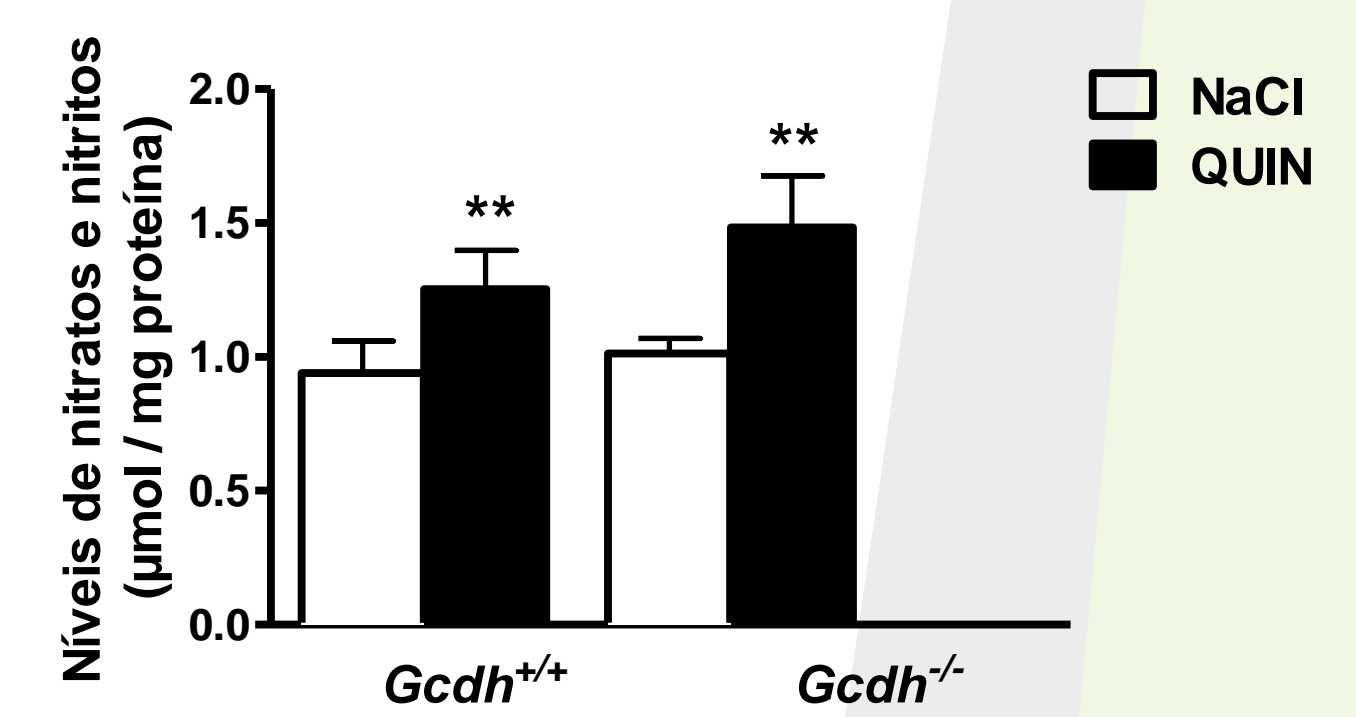


Fig 3. Níveis de nitrato e nitrito em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Nitrato e de nitrito foram medidos 24 h após uma única injeção intraestriatal de NaCl ou QUIN (50 nmol). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \*\* P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl (teste t de Student para amostras não pareadas).

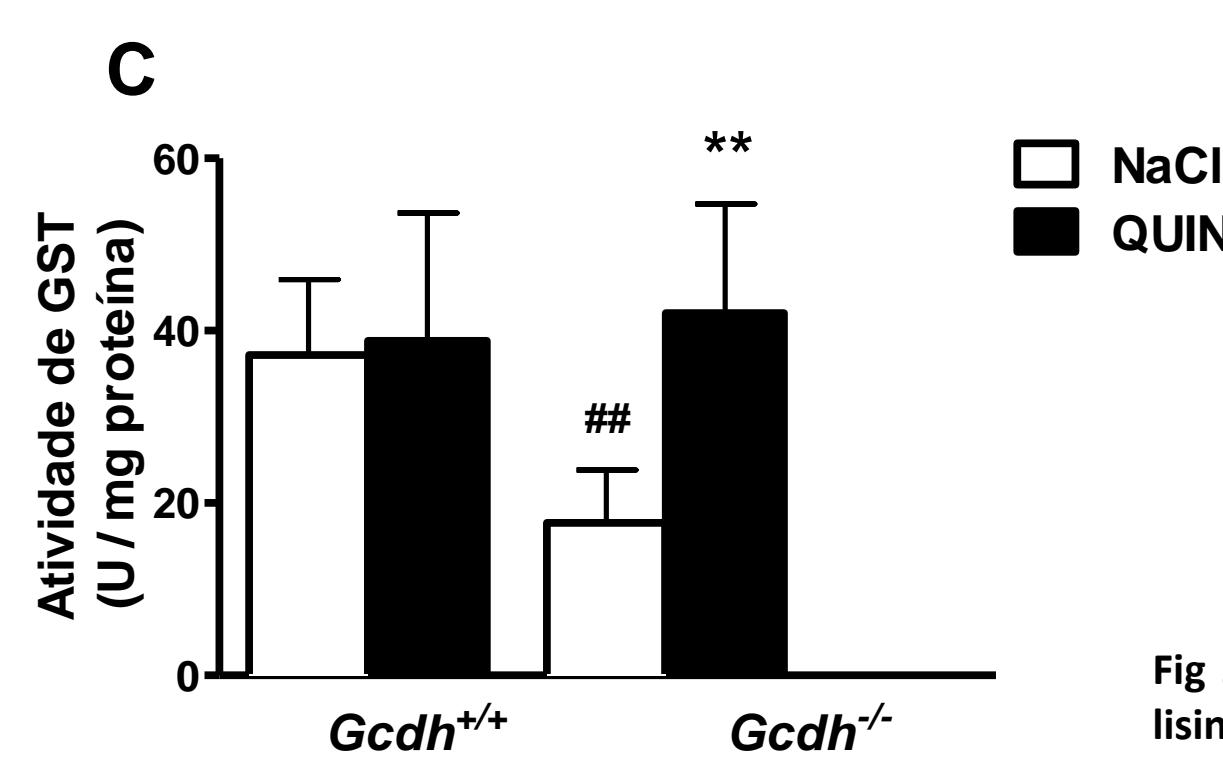
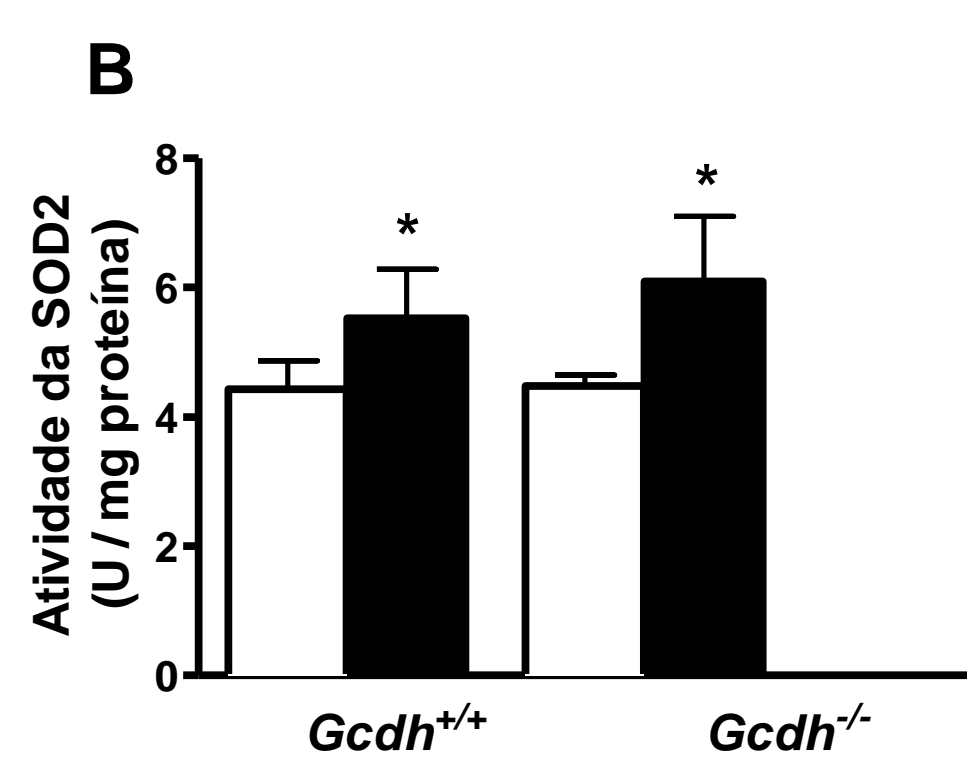
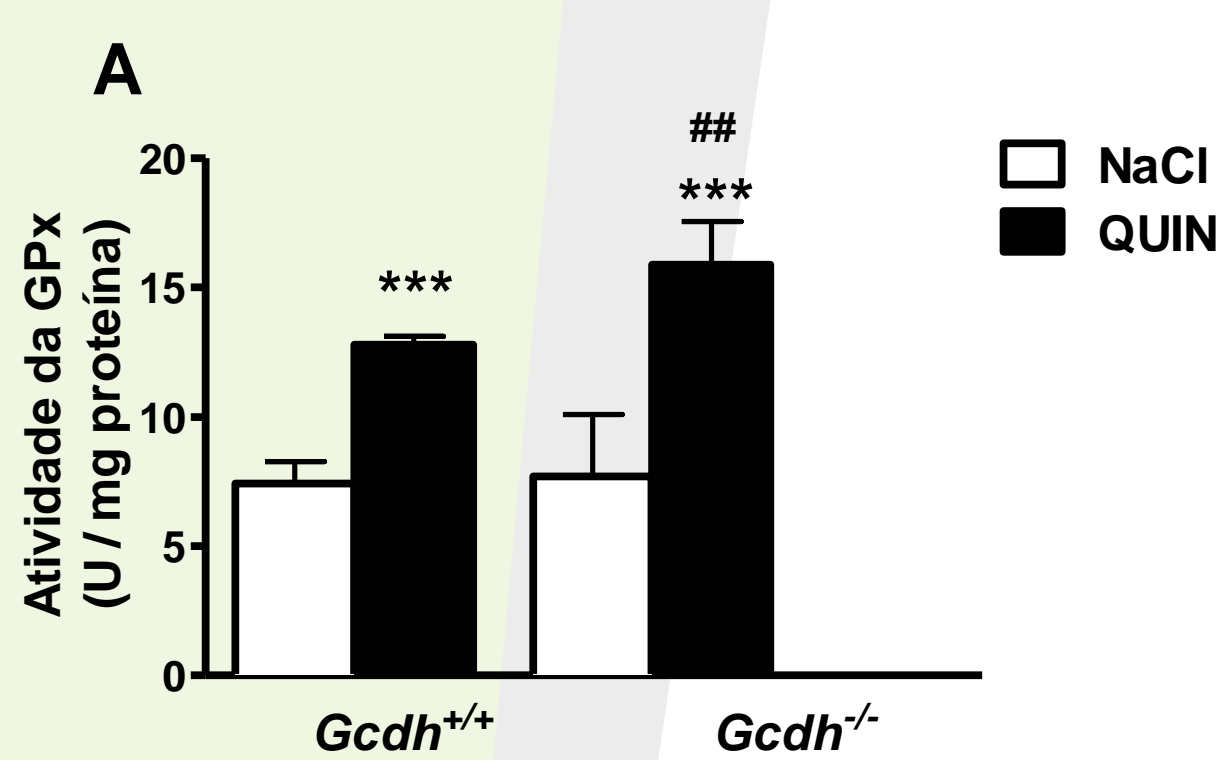


Fig 4. Atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx, A), superóxido dismutase 2 (SOD2, B) e glutatona-S-transferase (GST, C) em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 em comparação com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl, ### P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetados com QUIN (teste t de Student para amostras não pareadas).

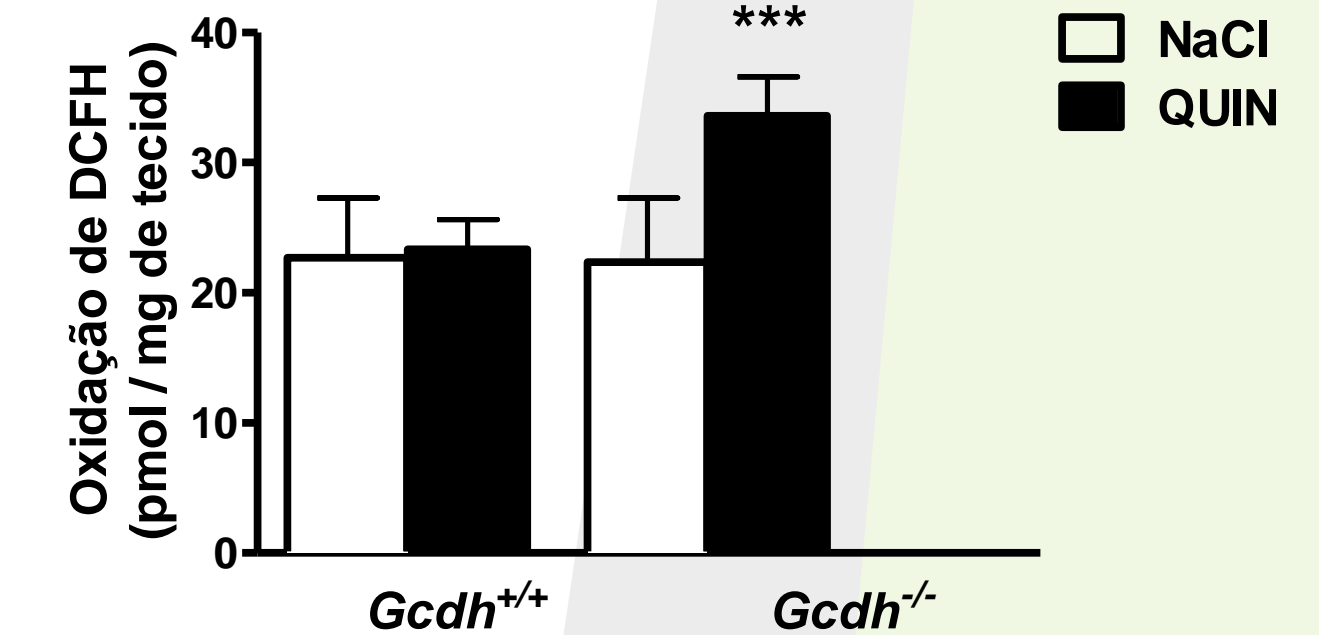


Fig 5. Oxidação de DCFH em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). A oxidação de DCFH foi medida 24 h após uma única injeção intraestriatal de NaCl ou QUIN (50 nmol). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \*\*\* P < 0,001, comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl; ### P < 0,001, em comparação com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetado com QUIN (teste t de Student para amostras não pareadas).

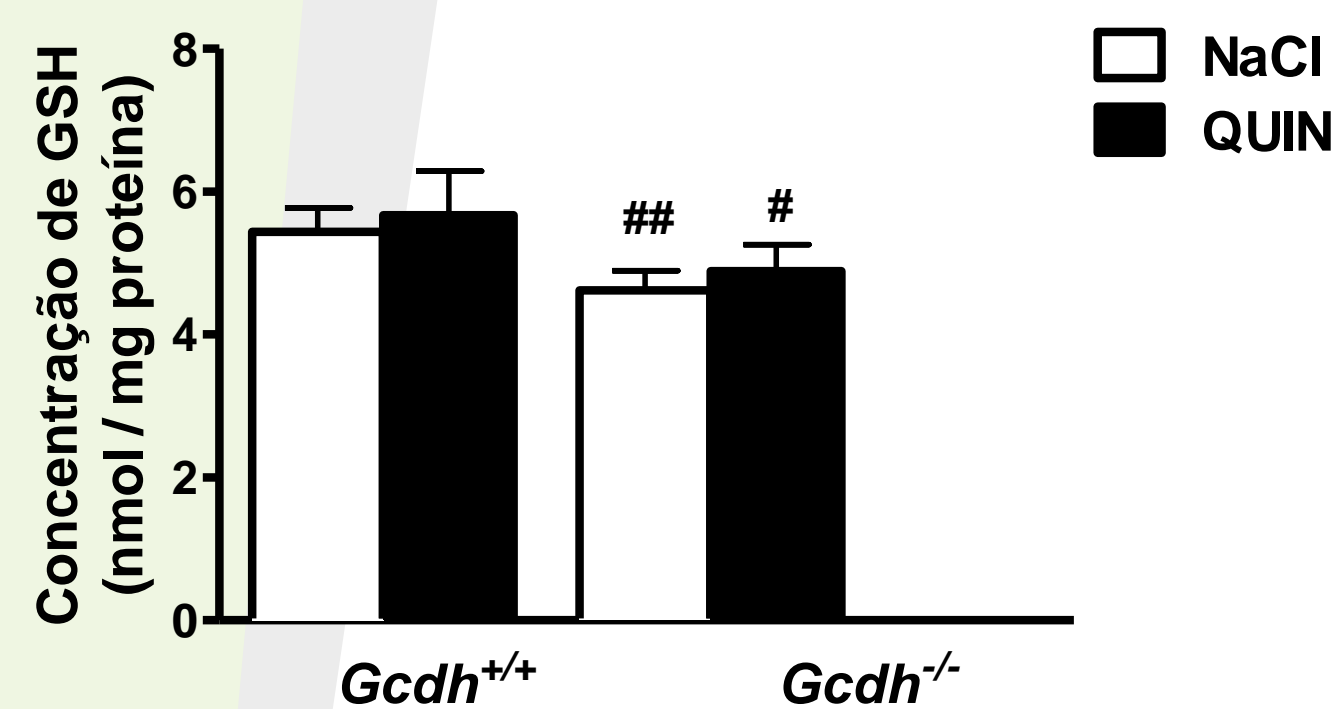


Figura 6. Concentração de glutatona reduzida (GSH) em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). # P < 0,05, ## P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetados com QUIN (teste t de Student para amostras não emparelhadas).

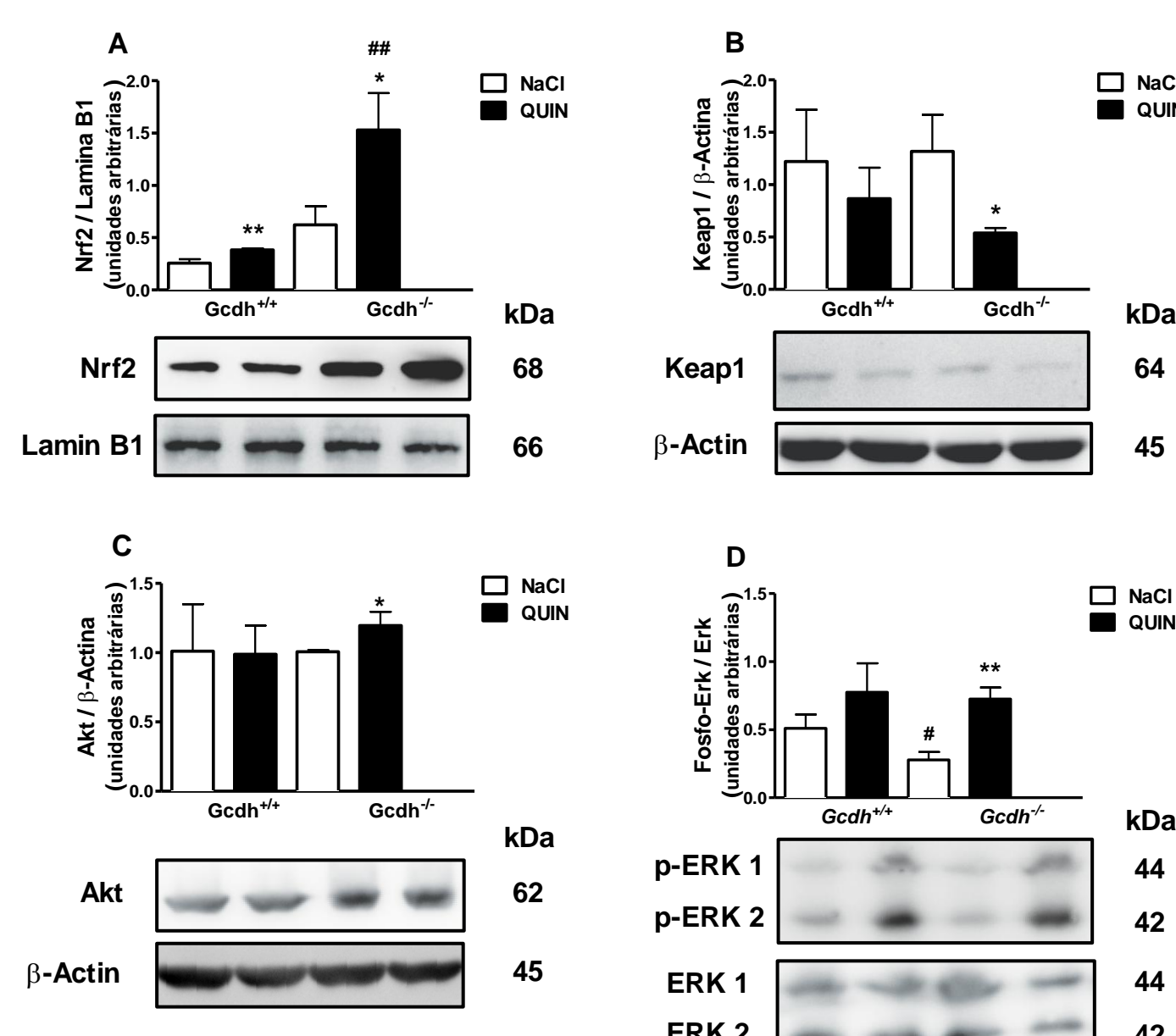


Fig 7. Immunoblot e análise densitométrica do conteúdo proteico de Nrf2 nuclear (A) e Keap1 (B), Akt (C) e fosfo-Erk 1/2 (D) citosólicos em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Lamin B1 e β-actina foram utilizados como controles endógenos. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl, # P < 0,05, ## P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetados com QUIN (teste t de Student para amostras não pareadas). Os níveis de proteína são expressos como unidades arbitrárias (AU).

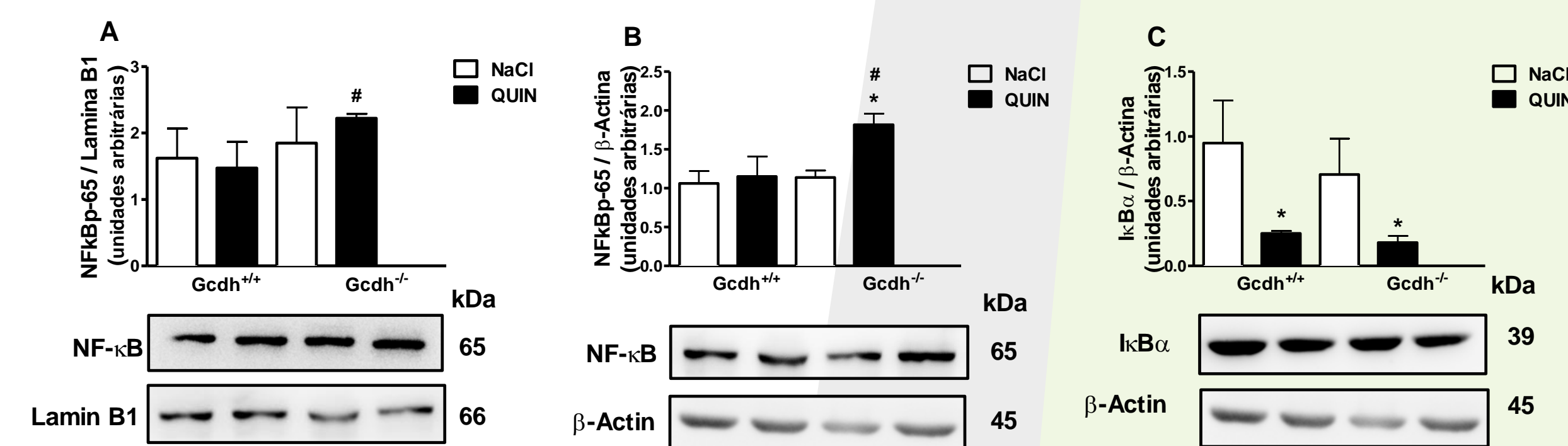


Fig 8. Immunoblot e análise por densitométrica do conteúdo proteico de NF-κB nuclear (A) e citosólico (B) em estriado de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina (4,7%). Lamin B1 e β-actina foram utilizados como controles endógenos. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão (cinco animais por grupo). \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>-/-</sup> - injetados com NaCl, # P < 0,05, ## P < 0,01, comparado com *Gcdh*<sup>+/+</sup> - injetados com QUIN (teste t de Student para amostras não emparelhadas). Os níveis de proteína são expressos como unidades arbitrárias (UA).

## Conclusão

Nossos resultados demonstram um comprometimento da homeostase redox associado à inflamação induzida por QUIN no estriado dos camundongos *Gcdh*<sup>-/-</sup> submetidos a uma dieta rica em lisina. Portanto, podemos presumir que o QUIN pode contribuir para a fisiopatogenia da degeneração estriatal em crianças com AG I especialmente durante os episódios de descompensação metabólica acompanhados por processos inflamatórios.

## Referências

- [1] Yagi 1998, Methods Mol. Biol. 108:107-110
- [2] Aksenov 2001, Neurosci. Lett. 302: 141-145
- [3] Navarro-González 1998, Clin. Chem. 44: 679-681, 1998
- [4] Wendel 1981, Methods Enzymol. 77:325-333
- [5] Marklund 1985, Handbook for oxygen radical research, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 243-247
- [6] Guthenberg and Mannervik 1981, Biochim. Biophys. Acta 661:255-260
- [7] LeBel 1992, Chem. Res. Toxicol
- [8] Browne and Armstrong 1998, Methods Mol. Biol. 108:347-352