

Evidência experimental de que a administração intracerebroventricular do ácido L-2-hidroxi-glutárico provoca estresse oxidativo em cérebro de ratos neonatos

Pedro Henrique da Rosa Correa¹, Moacir Wajner^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

² Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

A acidúria L-2-hidroxi-glutárica (L-2-HGA) é um doença neurometabólica caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção do ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG). A produção exacerbada do L-2-HG ocorre em decorrência da deficiência da enzima mitocondrial L-2-hidroxi-glutarato desidrogenase que é responsável pela conversão do L-2-HG em alfa-cetoglutarato. As manifestações clínicas nos pacientes acometidos por esse erro inato do metabolismo são essencialmente neurológicas, tais como retardo mental progressivo, ataxia cerebelar e macrocefalia. Em virtude do quadro clínico e de estudos de ressonância magnética que evidenciam anormalidades corticais e nos núcleos da base esta doença é considerada uma "acidúria orgânica cerebral". Ainda que o quadro clínico esteja bem estabelecido pouco se sabe a respeito da fisiopatogenia dos danos neurológicos apresentados por esses pacientes.

MATERIAIS E METODOS

Tendo em vista que o cérebro é suscetível ao estresse oxidativo por possuir limitadas defesas antioxidantes e uma elevada taxa metabólica e também por não haver nenhum estudo que avalie o efeito do L-2-HG no período neonatal, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da administração intracerebroventricular do L-2-HG sobre a homeostase redox. Ratos Wistar neonatos de 1 dia de vida foram anestesiados com uso do anestésico inalatório isoflurano e então receberam uma injeção única intracerebroventricular de L-2-HG (0,750 µmol/g, pH 7,4) na cisterna magna, 6 horas após a injeção os animais foram eutanasiados e tiveram seu córtex cerebral dissecado para ser utilizado na avaliação de parâmetros de homeostase redox celular.

RESULTADOS

Nossos resultados demonstraram que a administração do L-2-HG induziu peroxidação lipídica (aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), dano oxidativo proteico (aumento na formação de carbonilas e diminuição do conteúdo de grupamento sulfidrilas) (Fig 1), diminuição de defesa antioxidante (conteúdo de glutathione reduzida - GSH) (Fig 2), aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (aumento da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína), porém não observamos aumento na formação de espécies reativas de nitrogênio (conteúdo de nitratos e nitritos) (Fig 3). Além disso, observamos aumento na atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST), sem alterar a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) (Fig 4). Além disso, o aumento na lipoperoxidação e a diminuição nos níveis de GSH foram completamente revertidos quando os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal do antioxidante melatonina (20 mg/kg) ou do antagonista de receptores glutamatérgico NMDA MK-801 (0,25 mg/kg) uma hora antes da administração do L-2-HG (Fig 5).

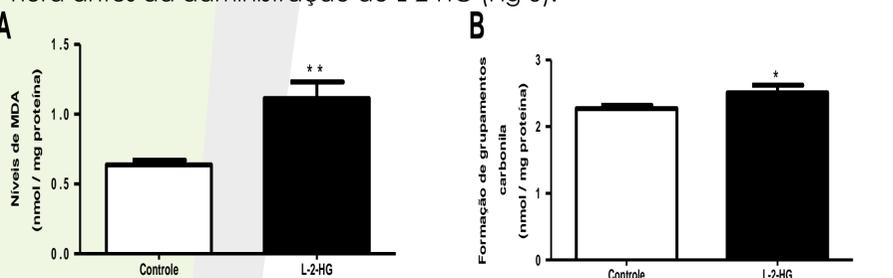


Fig. 1 Efeito da administração intracerebral de ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG; 0,750 µmol / g) nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas como concentração de malondialdeído (MDA) (a), formação de carbonilas (b) e teor de sulfidrilas (c) no córtex cerebral de ratos neonatos. Os dados são representados como média ± DP para quatro a seis experimentos (animais) realizados em triplicata e são expressos como nmol / mg de proteína. * P <0,5, ** P <0,01, comparado ao controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

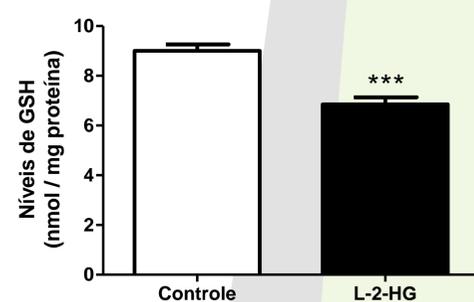


Fig. 2 Efeito da administração intracerebral de ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG; 0,750 µmol/g) nas concentrações de GSH no córtex cerebral de ratos neonatos. Os dados são representados como média ± DP por quatro a seis experimentos independentes (animais) realizados em triplicata e são expresso como nmol / mg de protea. *** P <0,001, comparado ao controle (Teste t de Student para amostras não pareadas)

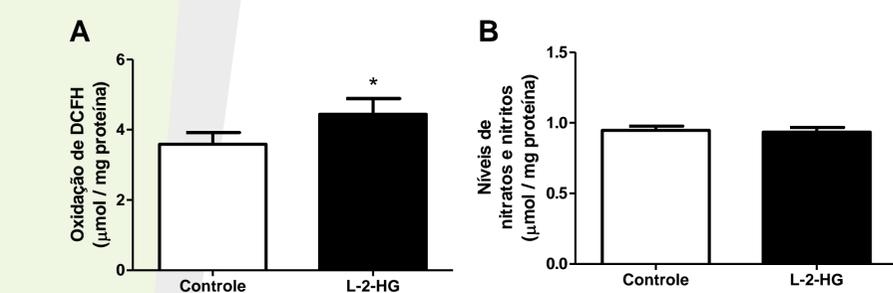


Fig. 3 Efeito da administração intracerebral de ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG; 0,750 µmol / g) na oxidação de DCFH (a) e concentrações de nitrato e nitrito (b) no córtex cerebral de ratos neonatos. Os dados são representados como média ± DP para quatro a seis experimentos (animais) realizados em triplicata e são expressos como µmol / mg de proteína. * P <0,5, comparado ao controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

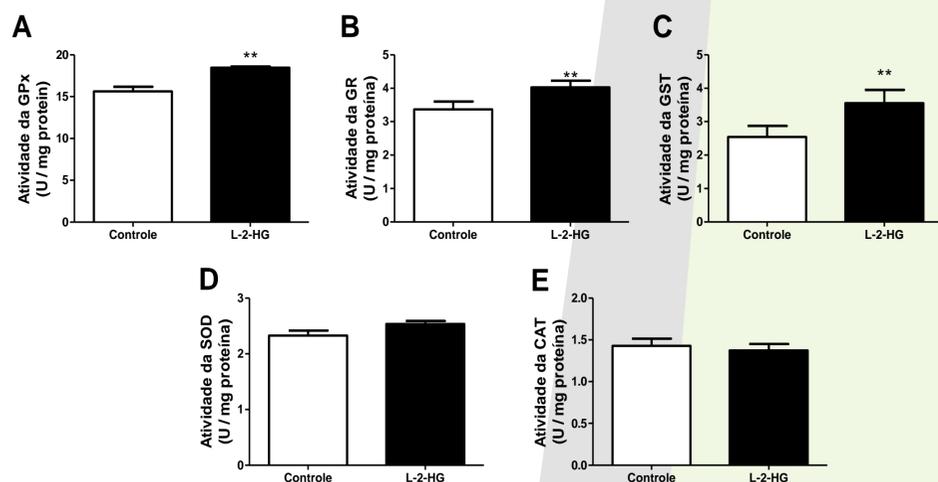


Fig. 4 Efeito da administração intracerebral de ácido L-2-hidroxi-glutárico(L-2-HG; 0,750 µmol / g) na atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) (a), glutathione redutase (GR) (b), glutathione S-transferase (GST) (c), superóxido dismutase (SOD) (d) e catalase (CAT) (e) no córtex de ratos neonatos. Os dados são representados como média ± DP para quatro a seis experimentos independentes (animais) realizados em triplicata e são expresso como U / mg de proteína. * P <0,05, ** P <0,01 comparado ao controle (Teste t de Student para amostras não pareadas)

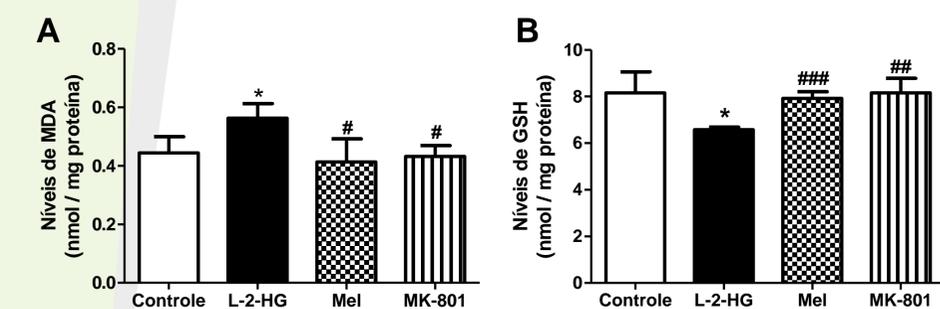


Fig 5. Efeito da melatonina (MEL; 20 mg / Kg) e MK-801 (0,25 mg / Kg) sobre o aumento induzido por ácido L-2-hidroxi-glutárico (L-2-HG 0,750 µmol / g) nos níveis de MDA (a) e diminuição das concentrações de GSH (b) no córtex cerebral de ratos neonatos. Os dados são representados como média ± DP por quatro a seis experimentos independentes (animais) realizados em triplicata e são expresso como nmol / mg de proteína. * P <0,05, comparado ao controle; #P <0,05, ## P <0,01, ### P <0,001, comparado a L-2-HG (teste t de Student para amostras não pareadas)

CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram um comprometimento da homeostase redox que pode estar associado a fisiopatogenia do dano cerebral nos pacientes acometidos pela L-2-HGA e também que o uso de compostos neuroprotetores (antioxidantes e moduladores glutamatérgicos) deve ser melhor investigado como uma alternativa importante de terapias adjuvantes no tratamento desse distúrbio neurometabólico.