

EFEITOS *IN VITRO* DO ÁCIDO METILMALÔNICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM SINAPTOSSOMAS DE CÉREBRO DE RATOS JOVENS

Clarissa Günther Borges¹; Carolina Gonçalves Fernandes¹; Bianca Seminotti¹; Alexandre Umpierrez Amaral¹; Ângela Zanatta¹; Lisiane Aurélio Knebel¹; Paula Eichler¹; Guilhian Leipnitz¹ e Moacir Wajner^{1,2}.

¹ Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil; ² Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil.

INTRODUÇÃO

A acidúria metilmalônica, uma das mais frequentes acidúrias orgânicas, é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de ácido metilmalônico (MMA). Os pacientes afetados por esta doença apresentam crises de encefalopatia e degeneração cerebral progressiva com anormalidades estruturais no putâmen e no córtex cerebral, gliose e hipomielinização. Contudo, a fisiopatologia do dano cerebral desta doença ainda não está bem estabelecida.

OBJETIVOS

O presente trabalho investigou os efeitos *in vitro* do MMA (0,2 – 10mM) sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em sinaptossomas de cérebro total de ratos jovens.

MÉTODOS

Ratos Wistar machos de 30 dias de vida foram sacrificados por decapitação e tiveram o cérebro total isolado para a obtenção dos sinaptossomas de acordo com o método de Springer e colaboradores (1998). Os sinaptossomas foram incubados a 37°C por 1 hora na presença (teste) ou na ausência (controle) do MMA.

Os seguintes parâmetros de estresse oxidativo foram investigados:

- Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) [Yagi, *Methods Mol Biol* 108:107-110, 1998];
- Formação de carbonilas [Levine *et al.*, *Methods Enzymol* 233:346-357, 1994];
- Oxidação da diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) [LeBel *et al.*, *Chem Res Toxicol* 5:227-223, 1992].

RESULTADOS

Nossos resultados demonstram que o MMA aumentou significativamente os níveis de TBA-RS em sinaptossomas (Figura 1A), indicando que esse ácido orgânico induz peroxidação lipídica. Verificamos ainda que a adição de MK-801 (Figura 1B) e dos antioxidantes trolox (análogo solúvel do α -tocoferol) (Figura 1C) e melatonina (Figura 1D) preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS causado pelo MMA, sugerindo o envolvimento de glutamato e a ação dos radicais hidroxila e peroxila, respectivamente, neste efeito. Além disso, o MMA aumentou a oxidação da DCF-DA (Figura 2), refletindo um aumento na produção de espécies reativas. Finalmente, observamos que o MMA induziu dano proteico, já que esse ácido orgânico aumentou significativamente a formação de carbonilas (Figura 3).

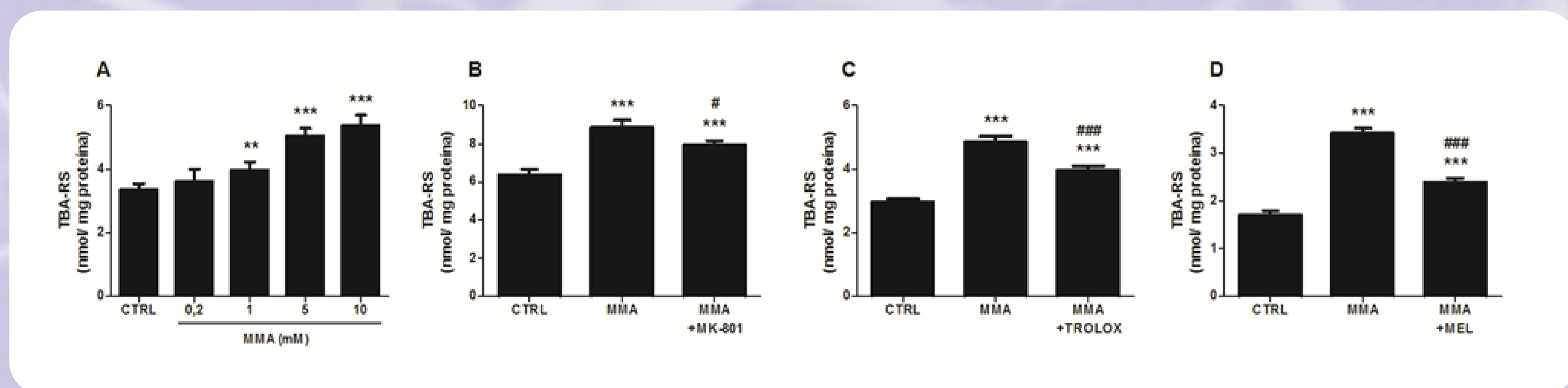


Figura 1 – Efeito *in vitro* do ácido metilmalônico (MMA) sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em sinaptossomas de cérebro total. Os sinaptossomas foram incubados durante 1 hora na presença de MMA (A). Em alguns experimentos os sinaptossomas foram co-incubados durante 1 hora com MMA (10mM) na presença de MK-801 (500 μ M), trolox (TRO, 10 μ M) ou melatonina (MEL, 1mM) (B, C e D). Os valores representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos realizados em triplicata. ** P<0,01, *** P<0,001, comparados com os controles; # P<0,05, ### P<0,001 comparados com o MMA (ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

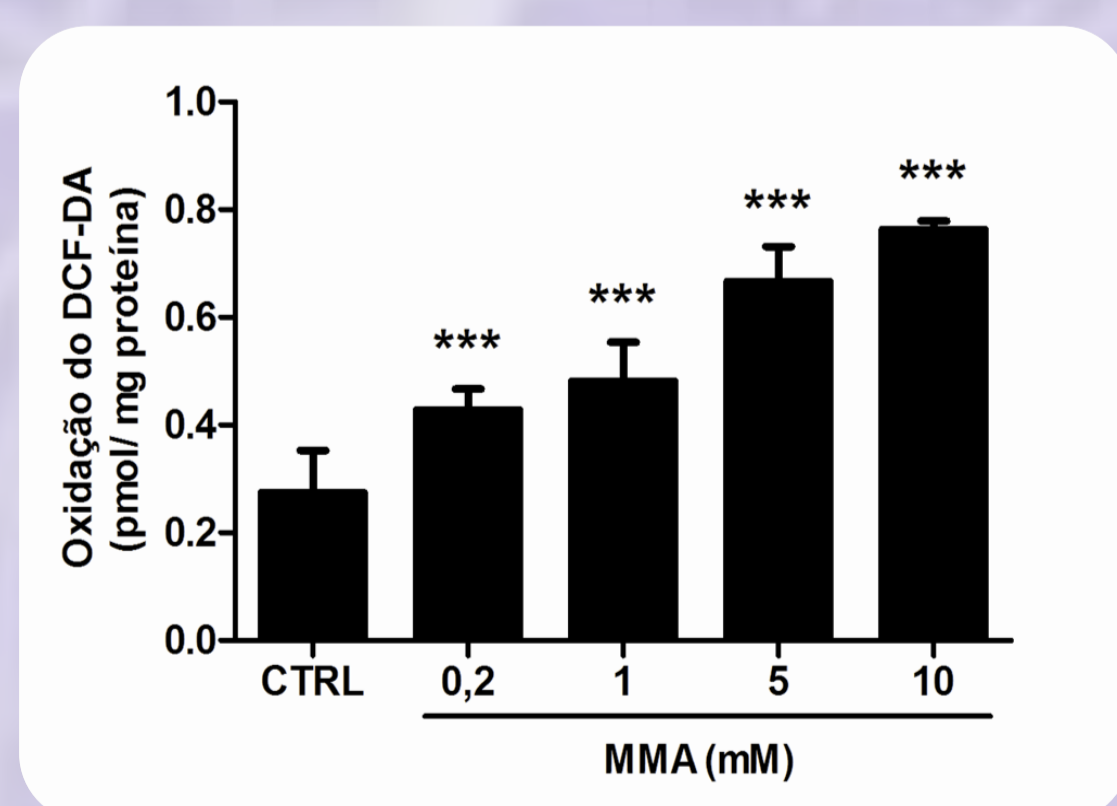


Figura 2 – Efeito *in vitro* do ácido metilmalônico (MMA) sobre a oxidação da diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) em sinaptossomas de cérebro total. Os valores representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos realizados em triplicata. *** P<0,001, comparados com o controle (ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

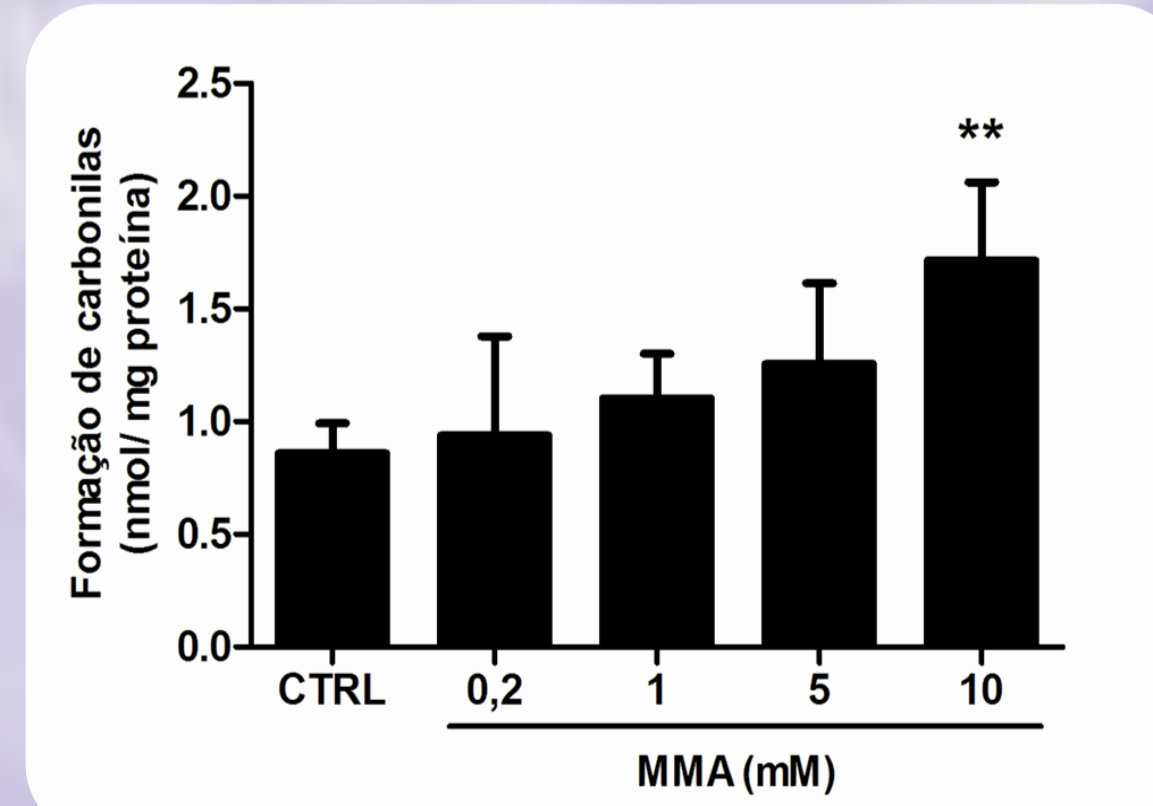


Figura 3 – Efeito *in vitro* do ácido metilmalônico (MMA) sobre a formação de carbonilas em sinaptossomas de cérebro total. Os valores representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos realizados em triplicata. ** P<0,01, comparados com o controle (ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere que a indução de dano oxidativo lipídico e proteico através do aumento da produção de espécies reativas causado pelo MMA possa representar um mecanismo fisiopatogênico envolvido na disfunção neurológica encontrada em pacientes afetados pela acidúria metilmalônica.