

Fernanda dos Santos Petry¹, Fernando Kreutz¹, Melissa Camassola², Ana Carolina Breier¹, Pedro Chagastelles³, Vanessa Schein¹, Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma¹, Nance Beyer Nardi² e Vera Maria Treis Trindade¹.
(¹Dep. Bioquímica - ICBS - UFRGS; ²ULBRA; ³Dep. Genética - IB - UFRGS)
fernanda.petry@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença de depósito lisossomal caracterizada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA), o que gera acúmulo cerebral dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato^(1,2). Os mecanismos pelos quais o acúmulo de GAGs gera os danos neurológicos característicos da patologia ainda são desconhecidos. Dados sugerem que o acúmulo destes compostos afete a atividade de enzimas de degradação de gangliosídeos, alterando a composição lipídica de membranas neurais⁽³⁾. Gangliosídeos são glicosfingolipídios contendo ácido siálico. Presentes em abundância em membranas neurais, apresentam funções sinalizatórias, participando de processos de maturação neural, mielinização, sinaptogênese, transmissão sináptica, e de mecanismos de neuroproteção e apoptose. Desta forma, alterações em seu conteúdo, perfil ou distribuição podem ter participação no desencadear dos danos neurológicos da MPS I.

OBJETIVOS

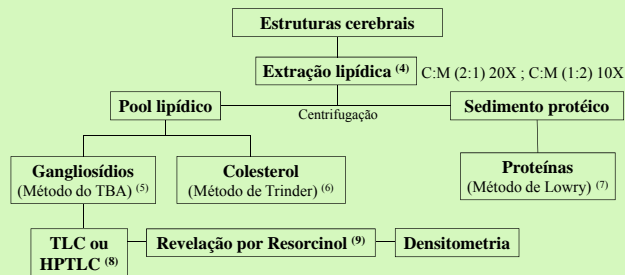
Avaliar o conteúdo, o perfil e a distribuição de gangliosídeos, bem como os níveis de colesterol em diferentes regiões cerebrais (córtex, cerebelo, hipocampo e hipotálamo) em um modelo murino de MPS I.

Avaliar a expressão dos genes das enzimas de síntese de gangliosídeos (GM3, GD3 e GM2/GD2 sintases) e da enzima de degradação neuraminidase 1 (Neu1) em cerebelo e hipocampo, a fim de elucidar as alterações lipídicas observadas.

METODOLOGIA

AVLIAÇÃO DOS NÍVEIS E DA DISTRIBUIÇÃO DE GANGLIOSÍDIOS

Foram utilizados um grupo de camundongos C57BL/6 *knock-out* (KO) para o gene da IDUA e um grupo selvagem (WT), ambos de 5 meses.



AVLIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE GANGLIOSÍDIOS

A expressão gênica das enzimas GM3, GD3, GM2/GD2 sintases e Neu1 foi avaliada em cerebelo e hipocampo por sq-RT-PCR.

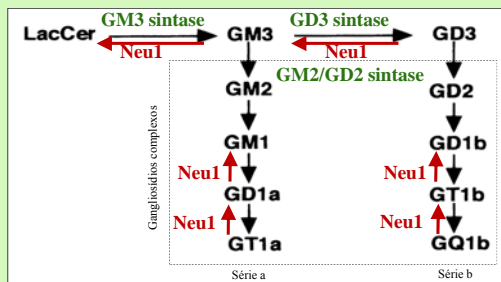


Figura 1: Metabolismo celular de gangliosídeos: As enzimas chaves de síntese (verde) e degradação (vermelho) dos gangliosídeos estão representadas. GM3 e GD3 sintases catalisam a síntese dos primeiros gangliosídeos (GM3 e GD3), ao passo que a GM2/GD2 sintase, cuja expressão acompanha o desenvolvimento do SNC, regula a síntese dos gangliosídeos complexos. A relação entre GD3 sintase/GM2-GD2 sintase determina a síntese das séries a e b dos gangliosídeos. A neuraminidase 1 (Neu1) figura como principal enzima de degradação de esfingolipídios contendo ácido siálico terminal.

ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por teste t de Student.

RESULTADOS

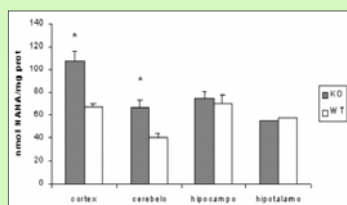


Figura 2: Conteúdo total de gangliosídeos nas diferentes estruturas cerebrais analisadas. Em córtex e cerebelo observou-se aumento no conteúdo total de gangliosídeos. KO: *knock-out*; WT: selvagem. (*) Significativamente diferente do grupo selvagem. Histogramas representam média \pm D.P. p < 0,05, n=7.

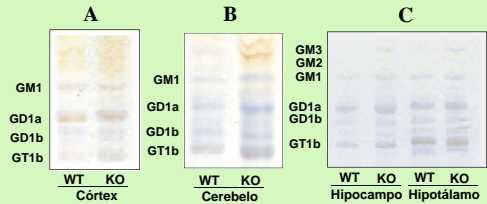


Figura 3: Perfil cromatográfico de gangliosídeos. O perfil de gangliosídeos foi avaliado por TLC ou HPTLC em (A) córtex; (B) cerebelo; (C) hipocampo e hipotálamo. Os principais gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) foram identificados nas estruturas cerebrais avaliadas tanto no grupo KO quanto no WT. Em córtex e cerebelo não foi observada diferença no perfil de gangliosídeos, já no hipocampo e hipotálamo o perfil foi afetado no grupo KO, com a identificação dos gangliosídeos GM3 e GM2. Imagens representativas de 5 diferentes experimentos. WT: selvagem; KO: *knock-out*.

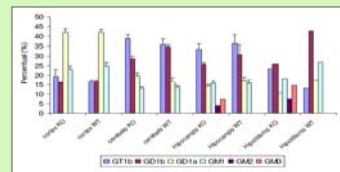


Figura 4: Distribuição percentual das diferentes espécies gangliosídicas por densitometria. Nenhuma diferença significativa na distribuição de gangliosídeos foi observada. KO: *knock-out*; WT: selvagem. Histogramas representam média \pm D.P. n=7.

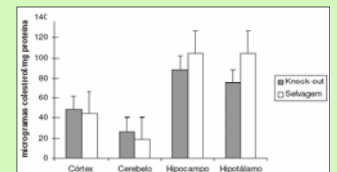


Figura 5: Conteúdo de colesterol nas estruturas cerebrais analisadas. Nenhuma diferença significativa foi observada. Histogramas representam média \pm D.P. n=7.

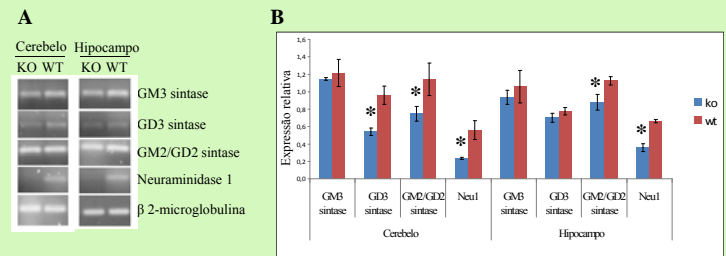


Figura 6: Expressão relativa dos genes de metabolismo de gangliosídeos. (A) Imagem representativa dos géis do sq-RT-PCR; (B) Quantificação das bandas de PCR. Duas estruturas foram avaliadas: cerebelo, que apresentou aumento no conteúdo de todos os gangliosídeos; e hipocampo, que embora não tenha sofrido alteração no conteúdo de gangliosídeos, teve seu perfil alterado, com acúmulo de GM3 e GM2. KO: *knock-out*; WT: selvagem. (*) Significativamente diferente do grupo selvagem, p<0,05. Dados representam média \pm E.P. n=4.

CONCLUSÕES

- Observou-se nos animais KO, aumento no conteúdo total de gangliosídeos de forma seletiva para córtex e cerebelo e aumento de GM3 e de GM2 em hipocampo e hipotálamo.
- Os níveis de colesterol não foram afetados.
- No cerebelo, houve redução na expressão de Neu1, GD3 sintase e GM2/GD2 sintase; e no hipocampo, redução de Neu1 e de GM2/GD2 sintase.
- Nossos dados sugerem que as alterações lipídicas observadas sejam decorrentes de um efeito conjunto sobre a degradação e biossíntese de gangliosídeos, possivelmente em decorrência do acúmulo de GAGs.
- O acúmulo de GM3 pode ser um indicio de retardo no desenvolvimento neural, visto que este gangliosídeo é expresso majoritariamente no SNC embrionário, ou pode estar envolvido diretamente com o dano neurológico por induzir apoptose^(10,11).
- As alterações lipídicas descritas podem estar relacionadas com a fisiopatologia da MPS I, o que fortalece a idéia de que a análise de gangliosídeos poderia servir como parâmetro bioquímico para estudo de dano e/ou neuroproteção no presente modelo.

REFERÊNCIAS

- Zheng Y, Rozengurt N, Ryazantsev S, Kohn DB, Stake N and Neufeld EF. Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab* 79:233-244, 2003;
- Liu Y, Xu L, Hennig AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Ogilvie JM, Cai S-R and Ponder KP. Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther* 11: 35-47, 2005;
- McGlynn R, Dobrenis K and Walkley SU. Differential sub cellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J Comp. Neurol.* 480(4):415-26, 2004;
- Folch, J, Leel, M, Sloane-Stanley, G.H. *J Biol. Chem.* 226, 497 – 509, 1957;
- Skoza, L., Mohos, S. *Biochem. J.* v. 159 p. 457-462, 1976;
- Bergmeyer, H.U. Cholesterol and Esterified Cholesterol. In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4, second ed. Verlag Chemie, pp. 1890 – 1893, 1974.
- Lowry et al. *J. Biol. Chem.*, v. 193 p. 265-275, 1951;
- Nores, G.A.; Mizutsumari, R. K.; Kremer D. M. *J. Chromat. A.*, 686 :155-157, 1994
- Svennerholm, L., *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604 – 611, 1957;
- Sohn H, Kim YS, Kim HT, Kim CH, Cho WE, Kang HY, Kim NS, Kim CH, Ryu SE, Lee JH, Ko JH. Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. *FASEB J* 2006 Jun;20(8):1248-50, 2006;
- Valaperta R, Chigorno V, Basso L, Prinetti A, Bresciani R, Preti A, Miyagi T, Sonnino S. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB J* 20(8):1227-9, 2006.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS.