

da Rosa, M.S.<sup>1</sup>, Seminotti, B.<sup>1</sup>, Fernandes, C.G.<sup>1</sup>, Borges, C.G.<sup>1</sup>, Leipnitz, G.<sup>1</sup>, Wajner, M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, HCPA - Porto Alegre, RS, Brasil

## INTRODUÇÃO

A acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA) é uma doença neurometabólica de herança autossômica recessiva causada por mutações no gene codificador da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase, a qual é responsável por catalisar o último passo da cetogênese e do catabolismo da leucina. A HMGA é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária dos ácidos 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG) e 3-metilglutárico (MGA) predominantemente. Os pacientes afetados apresentam principalmente sintomas neurológicos que normalmente aparecem no primeiro ano de vida, tais como hipotonia, retardo no desenvolvimento psicomotor, ataxia, movimentos coreatéticos e retardo mental, podendo evoluir para o coma [1].

## OBJETIVOS

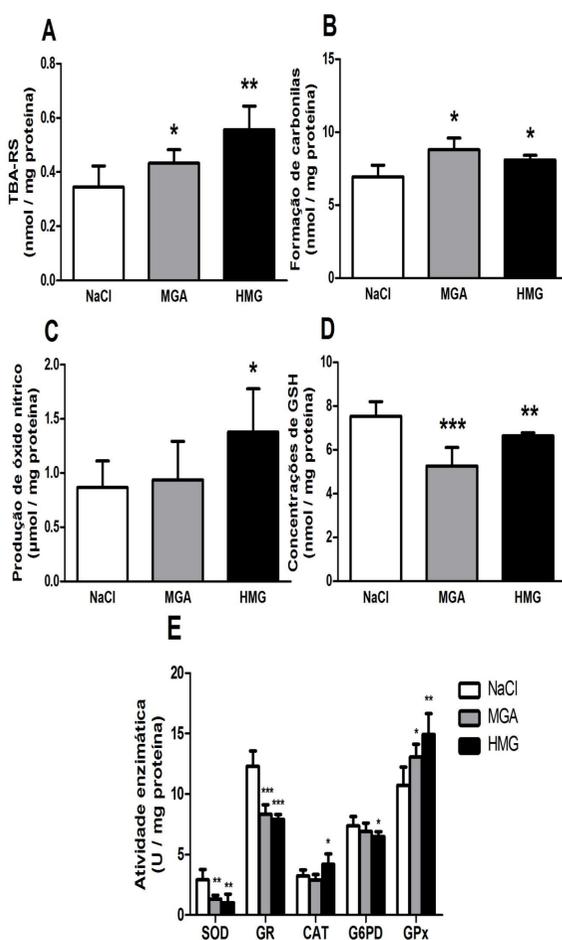
Visto que os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pelo dano cerebral na HMGA não estão totalmente esclarecidos, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal do HMG e do MGA sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em estriado de ratos jovens.

## MATERIAL E MÉTODOS

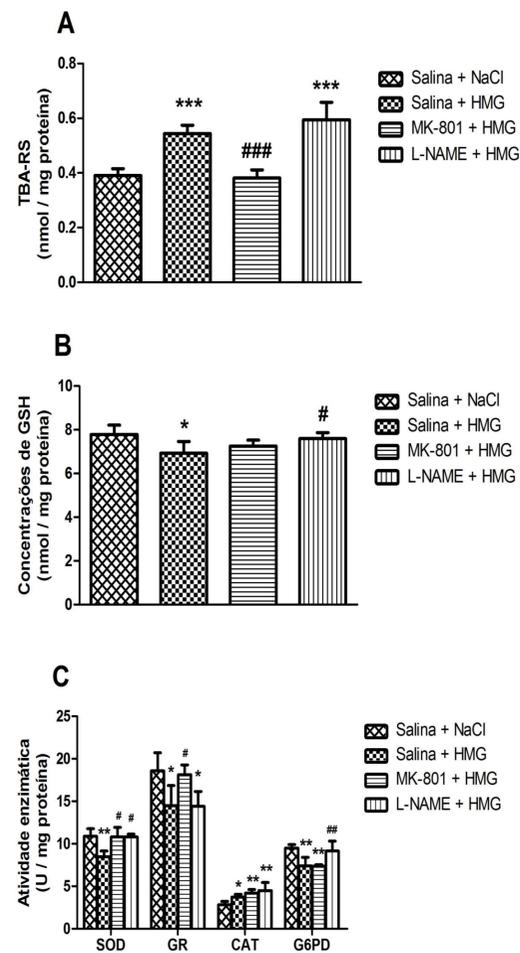
Ratos Wistar machos de 30 dias de idade receberam uma única injeção intraestriatal de HMG (4  $\mu$ mol), MGA (4  $\mu$ mol) ou NaCl (4  $\mu$ mol; grupo controle), e foram sacrificados 30 min após a administração. O estriado foi dissecado e homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM, pH 7,4, e centrifugado a 750 g durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram então utilizados para a avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) [2], formação de carbonilas [3], produção de óxido nítrico [4], concentrações de glutatona reduzida (GSH) [5] e as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) [6], glutatona peroxidase (GPx) [7], glutatona redutase (GR) [8], superóxido dismutase (SOD) [9] e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [10].

## RESULTADOS

Nossos resultados demonstram que a administração de HMG e MGA induziu peroxidação lipídica (aumento nos níveis de TBA-RS) (Figura 1A) e dano oxidativo proteico (formação de carbonilas) (Figura 1B) em estriado de ratos 30 min após a injeção. Também foi observado que o HMG, mas não o MGA, aumentou a produção de óxido nítrico (Figura 1C), indicando o envolvimento de espécies reativas de nitrogênio nos efeitos provocados pelo HMG. Além disso, o HMG e o MGA diminuíram as concentrações de GSH (Figura 1D), o mais importante antioxidante cerebral. A injeção de HMG e MGA aumentou significativamente a atividade da GPx e diminuiu as atividades da SOD e da GR (Figura 1E). Por outro lado, apenas o HMG aumentou a atividade da CAT e diminuiu a atividade da G6PDH (Figura 1E). Finalmente, foi verificado que a peroxidação lipídica (Figura 2A), a diminuição das concentrações de GSH (Figura 2B) e as alterações nas atividades das enzimas antioxidantes (Figura 2C) provocadas pelo HMG foram prevenidas pela injeção intraestriatal de MK-801 e L-NAME, sugerindo o envolvimento de receptores NMDA e da óxido nítrico sintase nesses efeitos.



**Figura 1.** Efeito *ex vivo* da administração intraestriatal dos ácidos 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG, 4  $\mu$ mol) e 3-metilglutárico (MGA, 4  $\mu$ mol) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS, A), formação de carbonilas (B), produção de óxido nítrico (C), níveis de glutatona reduzida (GSH, D) e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutatona peroxidase (GPx) (E) em estriado de ratos. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão para 6 experimentos independentes (animais) feitos em triplicata. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  em relação aos controles (ratos injetados com NaCl) (Teste *t* Student).



**Figura 2.** Efeito *ex vivo* do MK-801 (6 nmol) ou N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 0,2 nmol) sobre o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS, A), diminuição das concentrações de glutatona (GSH, B) e alterações das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), catalase (CAT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (C) induzidas pela administração intraestriatal do ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG, 4  $\mu$ mol). Valores representam média  $\pm$  desvio padrão para 6 experimentos independentes (animais) feitos em triplicata. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  em relação aos controles (ratos injetados com NaCl); # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  em relação ao HMG (Teste de Duncan).

## CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que o estresse oxidativo induzido *in vivo* pelo HMG e pelo MGA em estriado pode contribuir, pelo menos em parte, para a disfunção neurológica encontrada nos pacientes afetados pela HMGA.

## REFERÊNCIAS

- [1] Sweetman L e Williams JC. In: Scriver CR, BA, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 8<sup>o</sup> ed., 2001, p. 2340-2342; [2] Yagi K. Methods Mol Biol 1998, 108:107-10; [3] Levine et al., Methods Enzymol 1994, 233:346-357; [4] Navarro-González et al., Clin Chem 1998, 44:679-681; [5] Browne RW, Armstrong D. Method Mol Cell Biol 1998, 108:347-52; [6] Aebi H. Methods Enzymol 1984, 105:121-6; [7] Wendel A. Methods Enzymol 1981, 77:325-32; [8] Carlberg I, Mannervik B. Methods Enzymol 1985, 113:484-490; [9] Marklund SL. Handbook for oxygen radical research. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985, p. 243-7; [10] Leon SF, Clark JB. J Neurochem 1984, 43:106-11.