

# EFEITOS DA MENADIONA EM ASTRÓCITOS CORTICAIS DE CAMUNDONGOS NOCAUTE PARA A ENZIMA GLUTARIL-COA DESIDROGENASE

Gonçalves, A.M.<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 acidemia glutárica tipo I (AG I) é causada pela deficiência na atividade da enzima mitocondrial glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) que participa do catabolismo da lisina, levando ao acúmulo tecidual dos ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxi glutárico (3HG). Os pacientes apresentam leucoencefalopatia cortical progressiva, degeneração dos gânglios da base, além de crises encefalopáticas agudas. Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos da AG I não estão totalmente elucidados e várias hipóteses têm sido levantadas para explicar as manifestações neurológicas, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo, dano à barreira hematoencefálica e alterações bioenergéticas.

## Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi mimetizar condições de estresse oxidativo através da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona: vitaminaK3), uma importante molécula geradora de peróxido de hidrogênio e que em maiores concentrações produz radicais superóxido.

## Metodologia

Os efeitos da menadiona foram avaliados sobre parâmetros de estresse oxidativo em astrócitos corticais de camundongos nocautes para a enzima GCDH (*Gcdh*<sup>-/-</sup>) e camundongos normais (*Gcdh*<sup>+/+</sup>). Astrócitos corticais de camundongos (1 a 3 dias pós-natal) *Gcdh*<sup>+/+</sup> e *Gcdh*<sup>-/-</sup> obtidos de cultura primária foram mantidas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e quando confluentes, as células foram tratadas com DMEM 2% SFB na ausência ou presença de menadiona (25 e 50 µM) pelo período de 2 e 4 horas. Ao término do tratamento foram avaliados:

- A viabilidade celular através de MTT (brometo tiazolil azul de tetrazólio) e morte celular através da marcação PI (iodeto de propideo);
- Parâmetros de estresse oxidativo: GSH (concentrações de glutatona reduzida) e DCFH (oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína).

## Resultados e Discussão

Foi observado que a incubação com menadiona aumentou a marcação com PI e diminuiu o MTT, demonstrando que houve morte celular nas concentrações de 25 e 50 µM no período de 4hs para camundongos *Gcdh*<sup>-/-</sup>. Além disso, a menadiona provocou um aumento na oxidação do DCFH e diminuiu as concentrações de GSH.

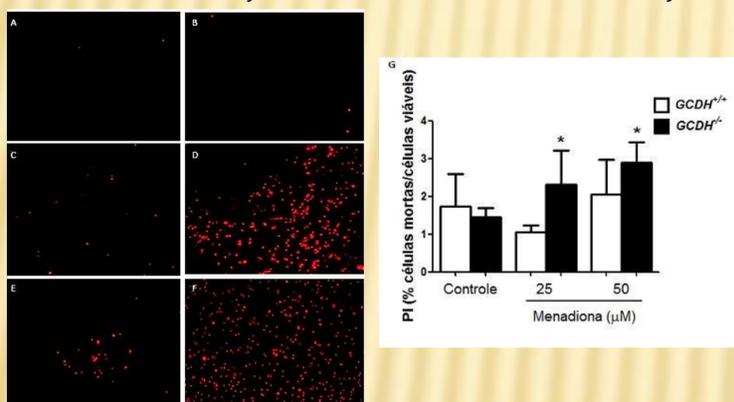


Figura 1- Incorporação do iodeto de propídio (PI) em astrócitos corticais de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (WT) e *Gcdh*<sup>-/-</sup> (KO) expostos a menadiona por 2 horas. (A) WT controle; (B) KO controle; (C) WT 25 µM; (D) KO 25 µM; (E) WT 50 µM; (F) KO 50 µM, (G) quantificação da incorporação do PI. Dados representados como média ± SD de três experimentos independentes (poços) realizados em triplicata e expressados como % de células mortas/células viáveis. \*\* *P* < 0.01 significativamente diferente dos camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (Teste t Student para amostras não pareadas).

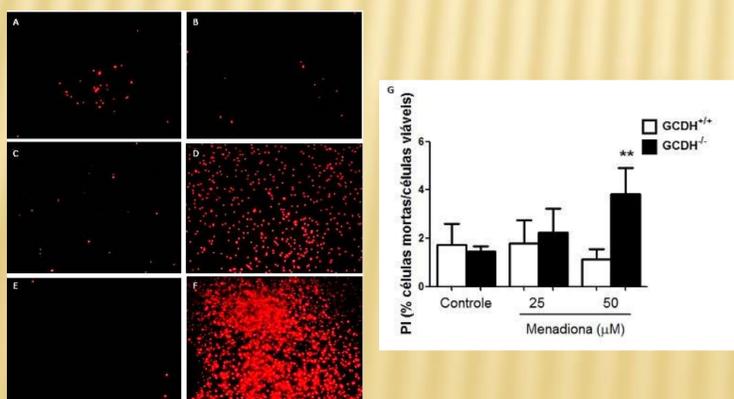


Figura 2- Incorporação do iodeto de propídio (PI) em astrócitos corticais de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (WT) e *Gcdh*<sup>-/-</sup> (KO) expostos a menadiona por 4 horas. (A) WT controle; (B) KO controle; (C) WT 25 µM; (D) KO 25 µM; (E) WT 50 µM; (F) KO 50 µM, (G) quantificação da incorporação do PI. Dados representados como média ± SD de três experimentos independentes (poços) realizados em triplicata e expressados como % de células mortas/células viáveis. \*\* *P* < 0.01 significativamente diferente dos camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (Teste t Student para amostras não pareadas).

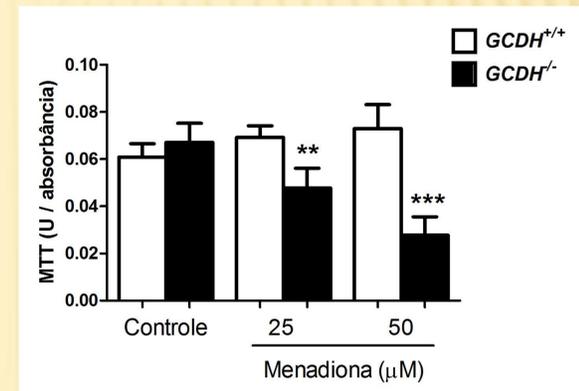


Figura 3- Viabilidade celular (brometo tiazolil azul de tetrazólio, redução do MTT) em astrócitos corticais de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (WT) e *Gcdh*<sup>-/-</sup> (KO) expostos a menadiona por 4 horas. Dados representados como média ± SD de três experimentos independentes (poços) realizados em triplicata e expressados como unidades arbitrárias por absorvância. \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001 significativamente diferente dos camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (Teste t Student para amostras não pareadas).

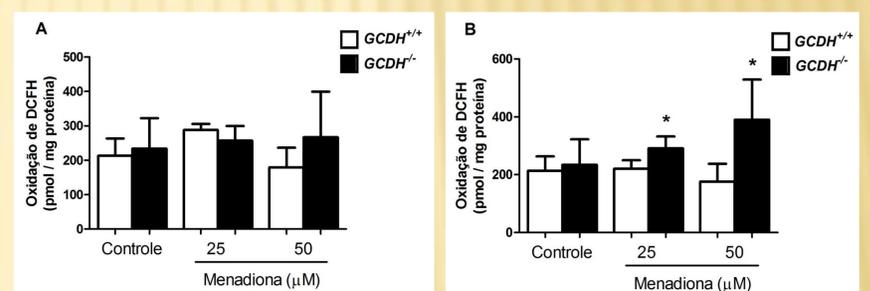


Figura 4- Oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) em astrócitos corticais de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (WT) e *Gcdh*<sup>-/-</sup> (KO) expostos a menadiona. (A) 2hs de exposição a menadiona; (B) 4 hs de exposição a menadiona. Dados representados como média ± SD de cinco a oito experimentos independentes (poços) realizados em triplicatas e expressados em pmol / mg de proteína. \* *P* < 0.05 significativamente diferente dos camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (Teste t Student para amostras não pareadas).

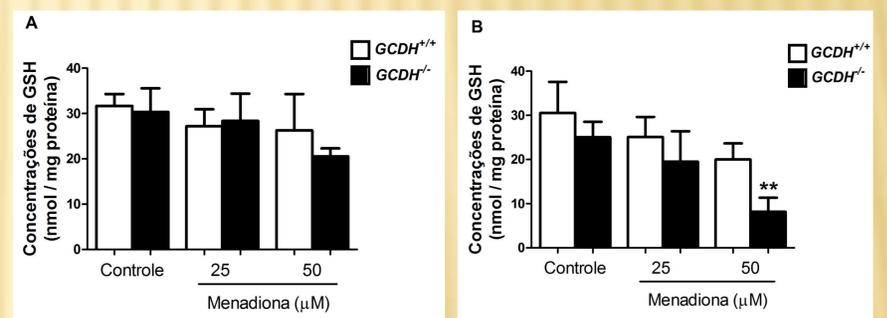


Figura 5- Redução de glutatona em astrócitos corticais de camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (WT) e *Gcdh*<sup>-/-</sup> (KO) expostos a menadiona. (A) 2hs de exposição a menadiona; (B) 4 hs de exposição a menadiona. Dados representados como média ± SD de cinco a dez experimentos independentes (poços) realizados em triplicatas e expressados em nmol / mg de proteína. \*\* *P* < 0.01 significativamente diferente dos camundongos *Gcdh*<sup>+/+</sup> (Teste t Student para amostras não pareadas).

## Conclusão

Estes resultados indicam que a menadiona causa uma diminuição da viabilidade celular das células, através do aumento na produção de espécies reativas e compromete as defesas antioxidantes do cérebro de camundongos *Gcdh*<sup>-/-</sup> quando comparados com os animais *Gcdh*<sup>+/+</sup>, podendo esta ser uma hipótese e um importante modelo para entender em parte, as manifestações neurológicas da acidemia glutárica tipo I.

## Referências bibliográficas

- Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A (2013) Characterization of adult rat astrocyte cultures. PLoS One 8, e60282.
- Quincozes-Santos A., Bobermin L. D., Latini A., Wajner M., Souza D. O., Golçalves C. A. and Gottfried C. (2013) Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. PLoS ONE 8, e64372.
- Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Gonçalves CA, Gottfried C (2009) The janus face of resveratrol in astroglial cells. Neurotox Res 16:30–41

Apoio financeiro: CNPq, PROPESq/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP IBN-Net and INCT-EN.