

# INDUÇÃO DE DANO OXIDATIVO LIPÍDICO E PROTEICO E REDUÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES PELOS ÁCIDOS ALFA-AMINOADÍPICO E ALFA-CETOADÍPICO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

Ribeiro, R.T.<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 alfa-cetoalópica é um erro inato do metabolismo da via de catabolismo da lisina, hidroxilisina e do triptofano. Causado por um defeito no complexo da alfa-cetoalópica desidrogenase, que leva ao acúmulo dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) alfa-cetoalópico (KA). Os pacientes são bioquimicamente caracterizados por uma alta excreção urinária do AA e KA e clinicamente por retardo mental, acidose metabólica, imunodeficiência, hipotonia com atraso no desenvolvimento motor e convulsões, cuja fisiopatologia é completamente desconhecida.

## OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* do AA e KA, nas concentrações de 0,5 a 4 mM, e de agentes antioxidantes como o trolox (Tro), melatonina (Mel) e resveratrol (RES) sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de córtex cerebral.

## MATERIAIS E MÉTODOS



Em alguns experimentos os antioxidantes: Trolox, melatonina e resveratrol foram co-incubados com o KA.

Os parâmetros da homeostase redox avaliados foram: oxidação do DCFH<sup>[6]</sup>, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)<sup>[1]</sup>, conteúdo de grupamentos sulfidríla<sup>[2]</sup>, conteúdo de nitratos e nitritos<sup>[3]</sup>, níveis de glutatona reduzida (GSH)<sup>[4]</sup> e formação de carbonilas<sup>[5]</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos que o AA e o KA induziram um aumento na oxidação da 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) (figura 1), indicando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, esses ácidos orgânicos aumentaram as concentrações de malondialdeído (TBA-RS : figura 2) e diminuíram o conteúdo de sulfidríla (figura 4), indicativos de dano oxidativo lipídico e proteico, além de diminuir os níveis de GSH (figura 5) que é a principal defesa antioxidante não-enzimática do cérebro. Verificamos ainda que o KA provocou um aumento na formação de carbonilas (figura 7), que representa outro importante marcador de dano oxidativo a proteínas, bem como aumentou a produção de nitratos e nitritos (figura 8), sugerindo o envolvimento de espécies reativas de nitrogênio no dano oxidativo causado por esse composto. Finalmente, os antioxidantes melatonina, trolox e resveratrol foram capazes de prevenir totalmente os efeitos provocados pelo KAA no TBA-RS (figura 2) e GSH (figura 5), reforçando o envolvimento de espécies reativas nos efeitos provocados pelos principais metabólitos acumulados na acidúria alfa-cetoalópica.

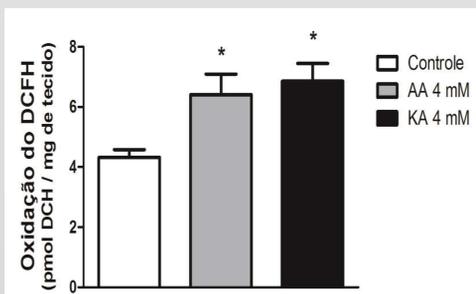


Fig 1. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre a oxidação do DCFH em fatias de córtex cerebral de ratos. A fatia de córtex cerebral foi incubada com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em pmol DCF / mg de tecido. \*P < 0,05 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

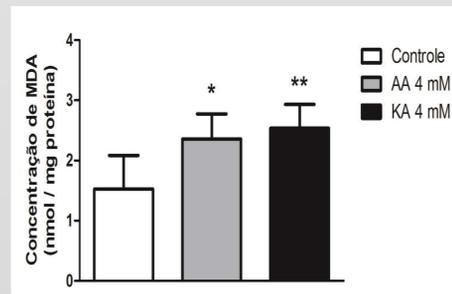


Fig 2. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre a concentração de malondialdeído (MDA) determinada pela medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em nmol MDA / mg proteína. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

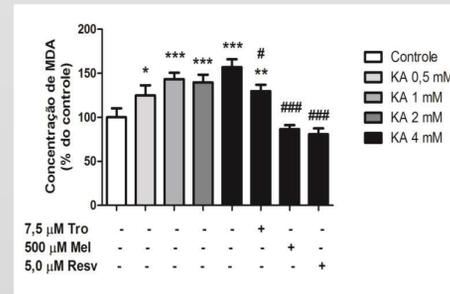


Fig 3. Influência dos antioxidantes trolox (Tro), melatonina (Mel) e resveratrol (Res) sobre o efeito do ácido ceto-alópico (KA) na concentração de malondialdeído (MDA) determinada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), expressas em concentração de malondialdeído (MDA) em córtex cerebral de rato. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA (0,5 - 4 mM) e em alguns experimentos os antioxidantes foram co-incubados na presença de KA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em porcentagem do controle (nmol de MDA / mg proteína). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 comparado com o controle, # P < 0,05, ### p < 0,001 comparado com KA 4mM (Anova de uma via seguido do teste de Duncan).

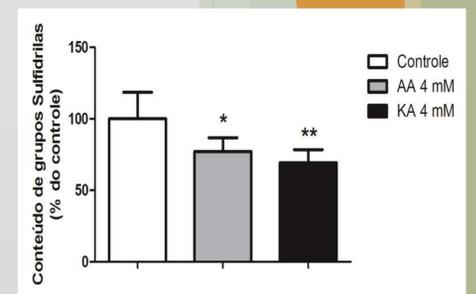


Fig 4. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em porcentagem do controle (nmol TNB / mg proteína). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

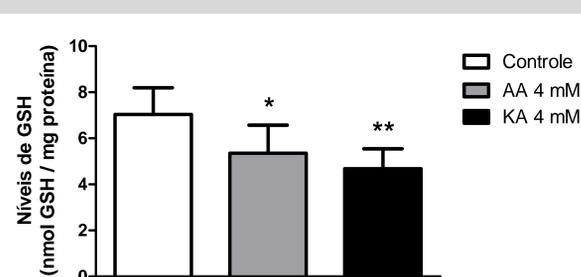


Fig 5. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre a concentração de glutatona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de rato. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em porcentagem do controle (nmol de GSH / mg proteína). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

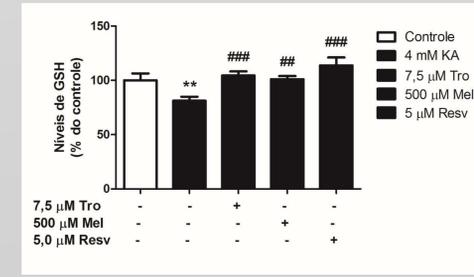


Fig 6. Influência dos antioxidantes trolox (Tro), melatonina (Mel) e resveratrol (Res) sobre o efeito do ácido ceto-alópico (KA) na concentração de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA (4 mM) e os antioxidantes foram co-incubados na presença de KA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em porcentagem do controle (nmol de GSH / mg proteína). \*\*P < 0,01, comparado com o controle, # P < 0,05, ## p < 0,01 e ### p < 0,001 comparado com KA 4mM (Anova de uma via seguido do teste de Duncan).

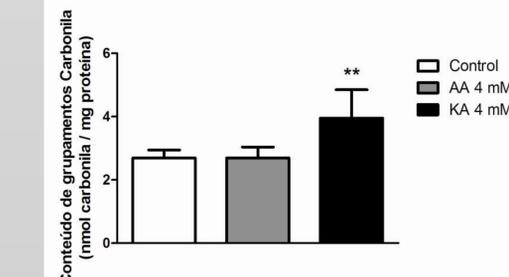


Fig 7. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre a formação de grupamentos carbonila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em nmol carbonila / mg proteína. \*\*P < 0,01 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

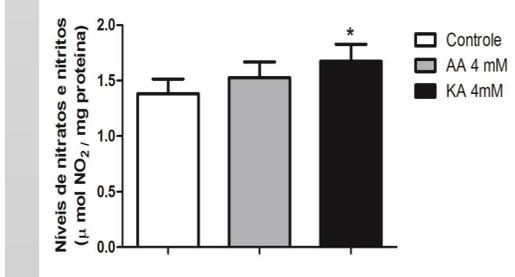


Fig 8. Efeito *in vitro* dos ácidos alfa-aminoalópico (AA) e ceto-alópico (KA) sobre os níveis de nitratos e nitritos em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. O sobrenadante do homogeneizado de córtex cerebral foi incubado com KA ou AA (4mM). Os valores de média  $\pm$  desvio padrão (seis animais por grupo) são expressos em μmol NO<sub>2</sub> / mg proteína. \*P < 0,05 comparado com o controle (Anova de uma via seguido do teste de Duncan)

## Conclusão

Analisando em conjunto, nossos resultados indicam fortemente que o estresse oxidativo pode estar envolvido nas alterações neurológicas característica dos pacientes acometidos pela acidúria alfa-cetoalópica e que a utilização de antioxidantes deveria ser melhor investigada como uma promissora terapia adjuvante ao tratamento desses pacientes.

## References

- [1] Yagi 1998, Methods Mol. Biol. 108:107-110
- [2] Aksenov 2001, Neurosci. Lett. 302: 141-145
- [3] Navarro-González 1998, Clin. Chem. 44: 679-681, 1998
- [4] Browne and Armstrong 1998, Methods Mol. Biol. 108:347-352
- [5] Reznick and Packer 1994, Methods Enzymol 233:357-363
- [6] LeBel 1992, Chem. Res. Toxicol