

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE SARCOSINA

SILVA, Juliano Dellazen¹, ANDRADE, Rodrigo Binkowski¹, WANNMACHER, Clovis Milton Duval¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; dellazen@me.com



paz no plural

INTRODUÇÃO

Sarcosinemia é uma condição autossômica recessiva relativamente rara que tem uma apresentação fenotípica variada e está associada com anormalidades neurológicas. Nesta doença o erro enzimático fenotípico mais comum afeta a atividade da sarcosina desidrogenase.

A sarcosinemia é um fenótipo caracterizado pela concentração aumentada de sarcosina (N-metilglicina) no plasma e excreção aumentada de sarcosina na urina. Os pacientes com sarcosinemia apresentam retardo mental ou problemas neurológicos.

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento significativo na concentração intracelular de espécies oxidantes como espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio e/ou pela perda de defesas antioxidantes.

OBJETIVO

Considerando-se que a cadeia respiratória mitocondrial e a rede de fosforotransferência são cruciais para a função e o metabolismo energético do cérebro, que o estresse oxidativo tem sido constantemente ligado a doenças neurodegenerativas e que os mecanismos subjacentes à disfunção neurológica em pacientes com sarcosinemia são pouco conhecidos o presente trabalho investigou o efeito da administração aguda de sarcosina e/ou creatina mais piruvato na fosforilação oxidativa (atividades do complexo da cadeia respiratória II-IV), enzimas da rede de fosforotransferência (atividades da PK, AK, HK, CK e GAPDH) e neurotransmissão (atividade de Na⁺, K⁺-ATPase) em córtex cerebral homogeneizados de ratos jovens.

METODOLOGIA

• Para o efeito agudo foram administrados via subcutânea e/ou intraperitonealmente com um intervalo de 3 horas, 10 µL de solução salina (grupo controle), 0,5 µmol/g de sarcosina (grupo sarcosina), 0,4 µg/g de creatina + 0,2 µg/g de creatina + piruvato (grupo creatina ± piruvato) e sarcosina + creatina + piruvato (grupo sarcosina + creatina + piruvato).

• Os animais foram mortos 1 hora após a última injeção e o córtex cerebral retirado para análise bioquímica.

• Para as redes de fosforotransferência seguiu-se os seguintes métodos: a determinação da atividade da hexoquinase foi determinada com base no método de Da-Silva WS (2004) com modificações, a atividade da GAPDH foi determinada com base no método de Mazzola JL (2005) com modificações, a análise da Piruvato quinase seguiu o método de Leong SF (1981), a atividade da Adenilato quinase seguiu o método de Dzeja PP (1999), a atividade da Creatina quinase seguiu o método de Huges BP (1962).

• Para determinação das atividades do complexo da cadeia respiratória seguiu-se os seguintes métodos: complexo II e complexo II + CoQ + complexo III seguiu-se o método de Fisher J (1985), a atividade do complexo IV seguiu o método de Rustin P (1994), a atividade de SDH foi medida segundo Sorensen e Mahler (1982).

• Os parâmetros para a determinação de estresse oxidativo foram: o teor total de sulfidrilas segundo Aksenov (2001), a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio seguiram de acordo com LeBel CP (1992), a atividade de SOD seguiu como descrito por Marklund SL (1985), a atividade de GPx seguiu o método de Wendel A (1981), a determinação de proteínas seguiu o método de Lowry OH (1951).

• A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey quando o valor de F foi significativo e/ou teste T de Student (p<0,05) através do programa estatístico SPSS 20.0.

RESULTADOS

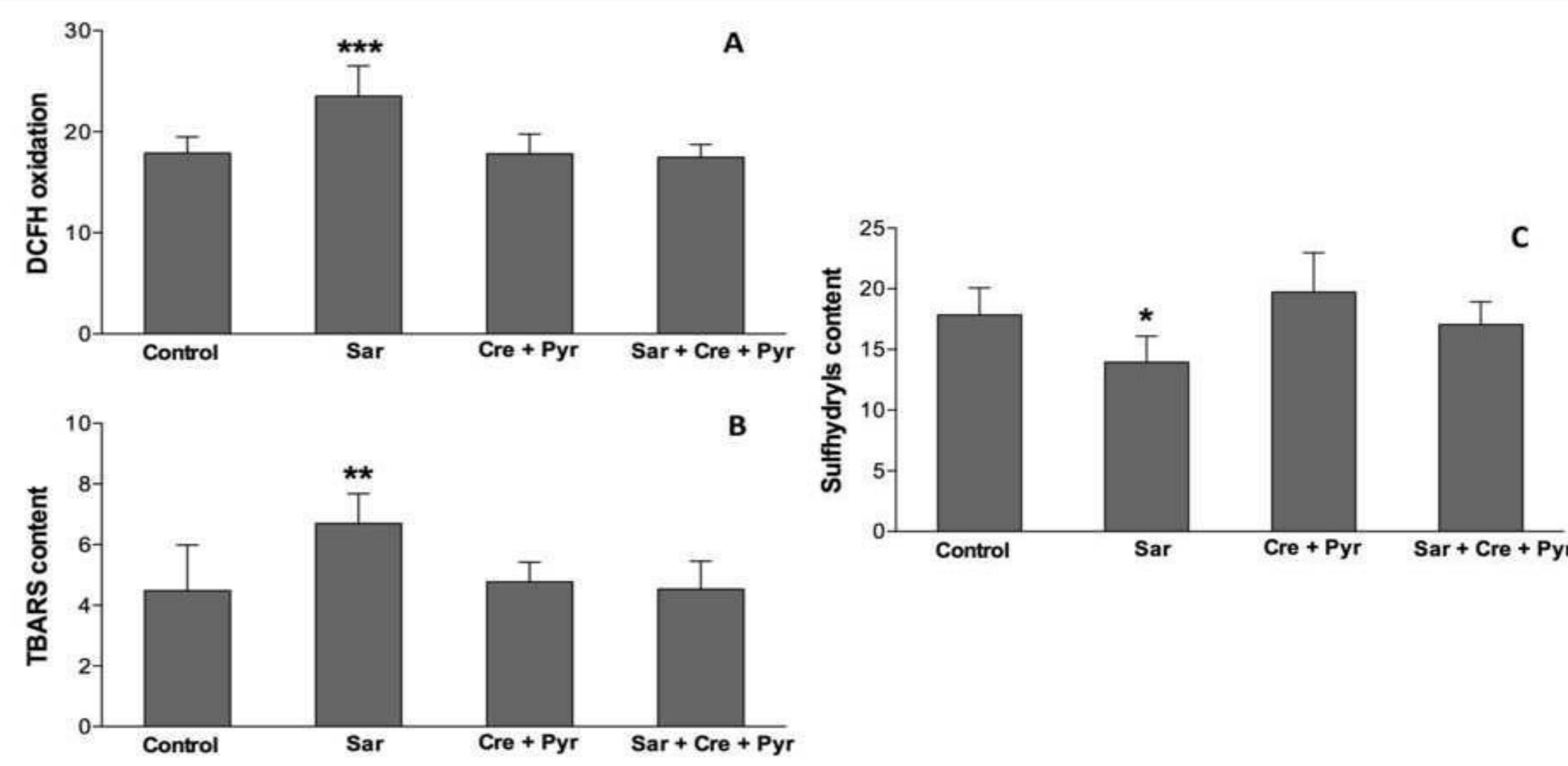


Fig. 1 Efeito da administração aguda de sarcosina na oxidação DCFH (A), TBARS (B) e sulfidrilas totais (C) em córtex cerebral de ratos. Os dados de oxidação DCFH estão expressos como nmol de DCF (2',7'-dihidrodicloro fluoresceína) formada por mg de proteína; os dados de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) são expressos como nmol de TBARS formados por mg de proteína; dados de sulfidrilas totais são expressos como nmol de TNB (ácido tionitrobenzênico) por mg de proteína. Os dados estão expressos como média ± DP para sete experimentos independentes realizados em triplicata. Sarcosina (0,5 mmol/g de peso corporal, por via subcutânea), Cre (creatina) (0,4 mmol/g), Pir (piruvato) (0,2 mmol/g), no qual a solução salina e creatina mais piruvato foram administradas i.p.). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com os outros grupos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey).

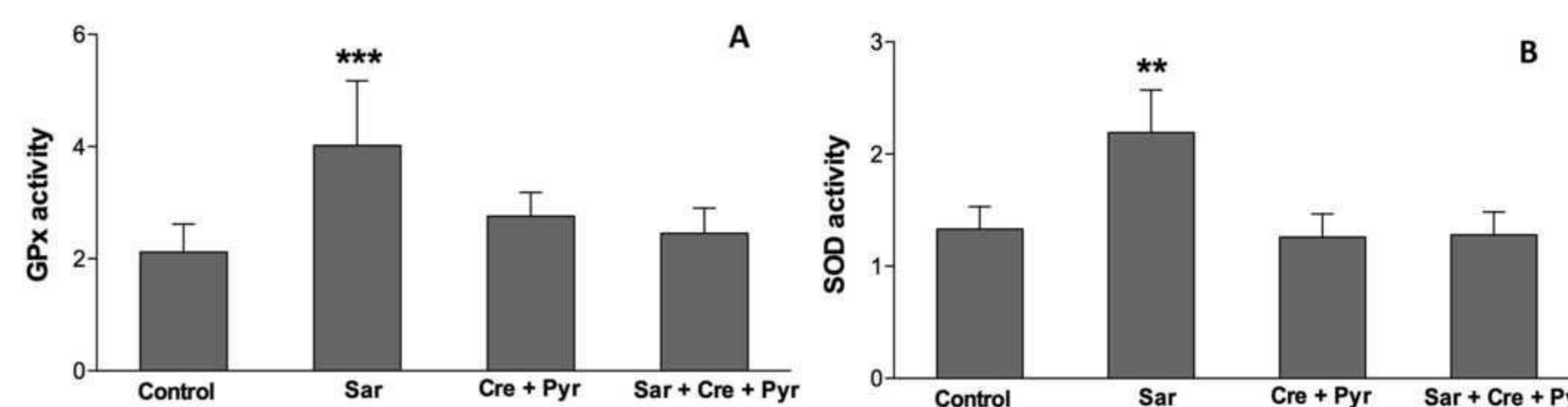


Fig. 2 Efeito da administração aguda de sarcosina sobre a atividade de GPx (A) e SOD (B) em córtex cerebral de ratos. Os dados de GPx (glutaciona peroxidase) estão expressos como umol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína; os dados de SOD (superóxido dismutase) estão expressos como unidades de SOD por mg de proteína. Os dados estão expressos como média ± DP para sete experimentos independentes realizados em triplicata. Sarcosina (0,5 mmol/g de peso corporal, por via subcutânea), Cre (creatina) (0,4 mmol/g), Pir (piruvato) (0,2 mmol/g), no qual a solução salina e piruvato mais creatina foram administradas i.p.). **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com os outros grupos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey).

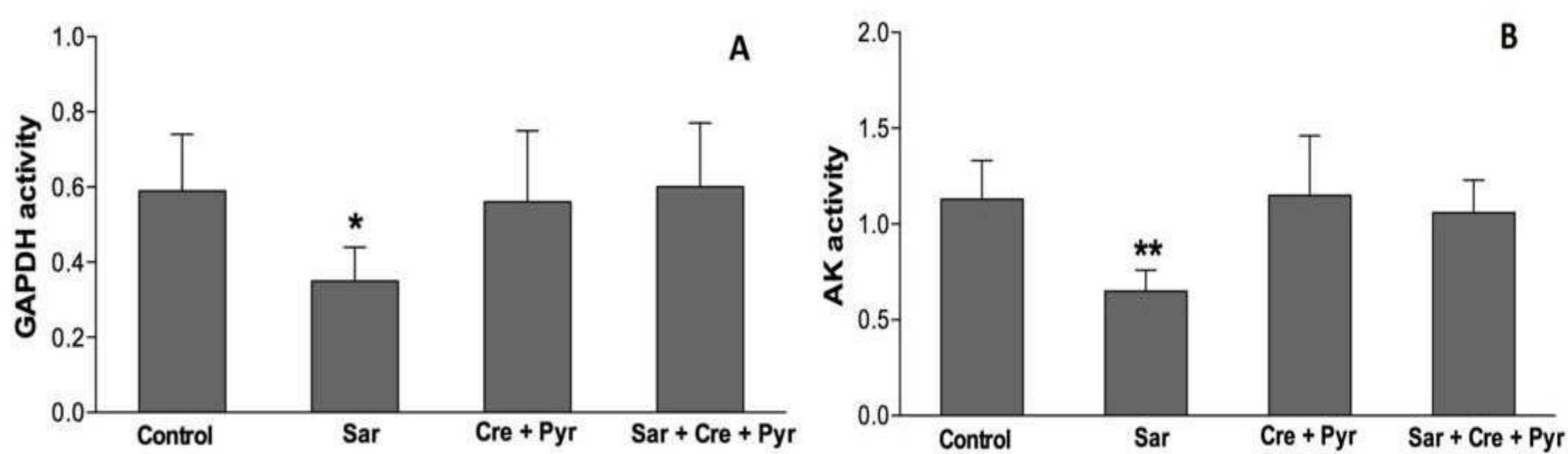


Fig. 3 Efeito da administração aguda de sarcosina sobre as atividades das enzimas GAPDH (A) e AK (B) em córtex cerebral de ratos. Os resultados da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) estão expressos como umol de NADH por min por mg de proteína; os dados de AK estão expressos como umol de ATP por minuto por mg de proteína. Os dados estão expressos como média ± DP para sete experimentos independentes realizados em triplicata. Sarcosina (0,5 mmol/g de peso corporal, por via subcutânea), Cre (creatina) (0,4 mmol/g), Pir (piruvato) (0,2 mmol/g), no qual a solução salina e piruvato mais creatina foram administradas i.p.). *p<0,05; **p<0,01 em comparação com os outros grupos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey).

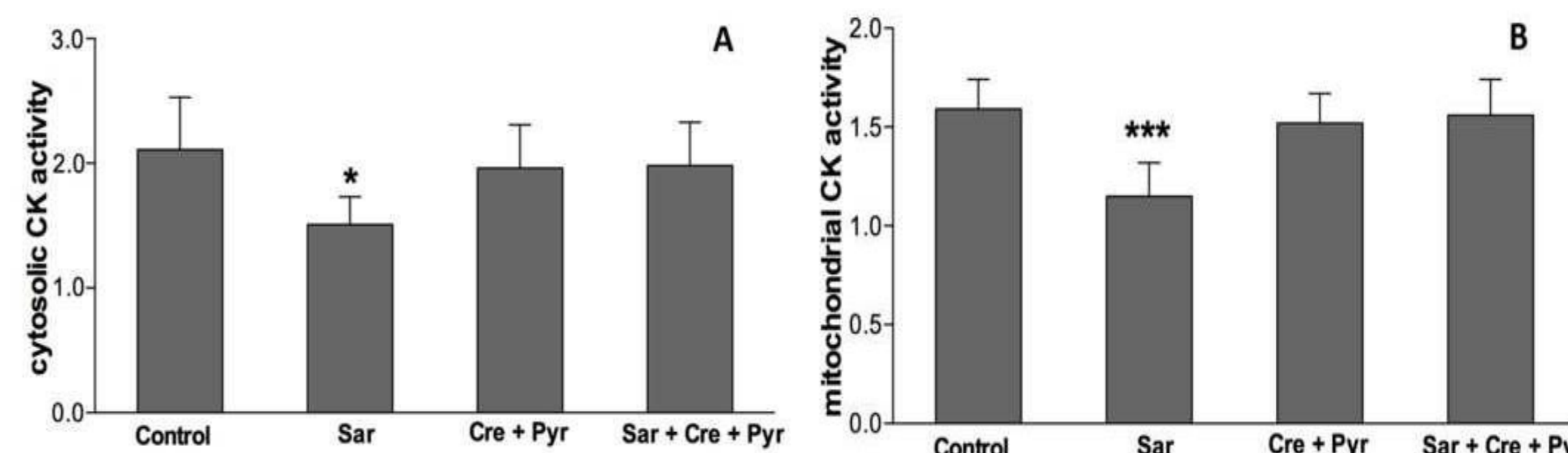


Fig. 4 Efeito da administração aguda de sarcosina na atividade da CK citosólica (A) e mitocondrial (B) em córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos como nmol de creatina por minuto por mg de proteína. Os dados são expressos como média ± DP para sete experimentos independentes realizados em triplicata. Sarcosina (0,5 mmol/g de peso corporal, por via subcutânea), Cre (creatina) (0,4 mmol/g), Pir (piruvato) (0,2 mmol/g), no qual a solução salina e piruvato mais creatina foram administradas i.p.). *p<0,05; ***p<0,001 em comparação com os outros grupos (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey).

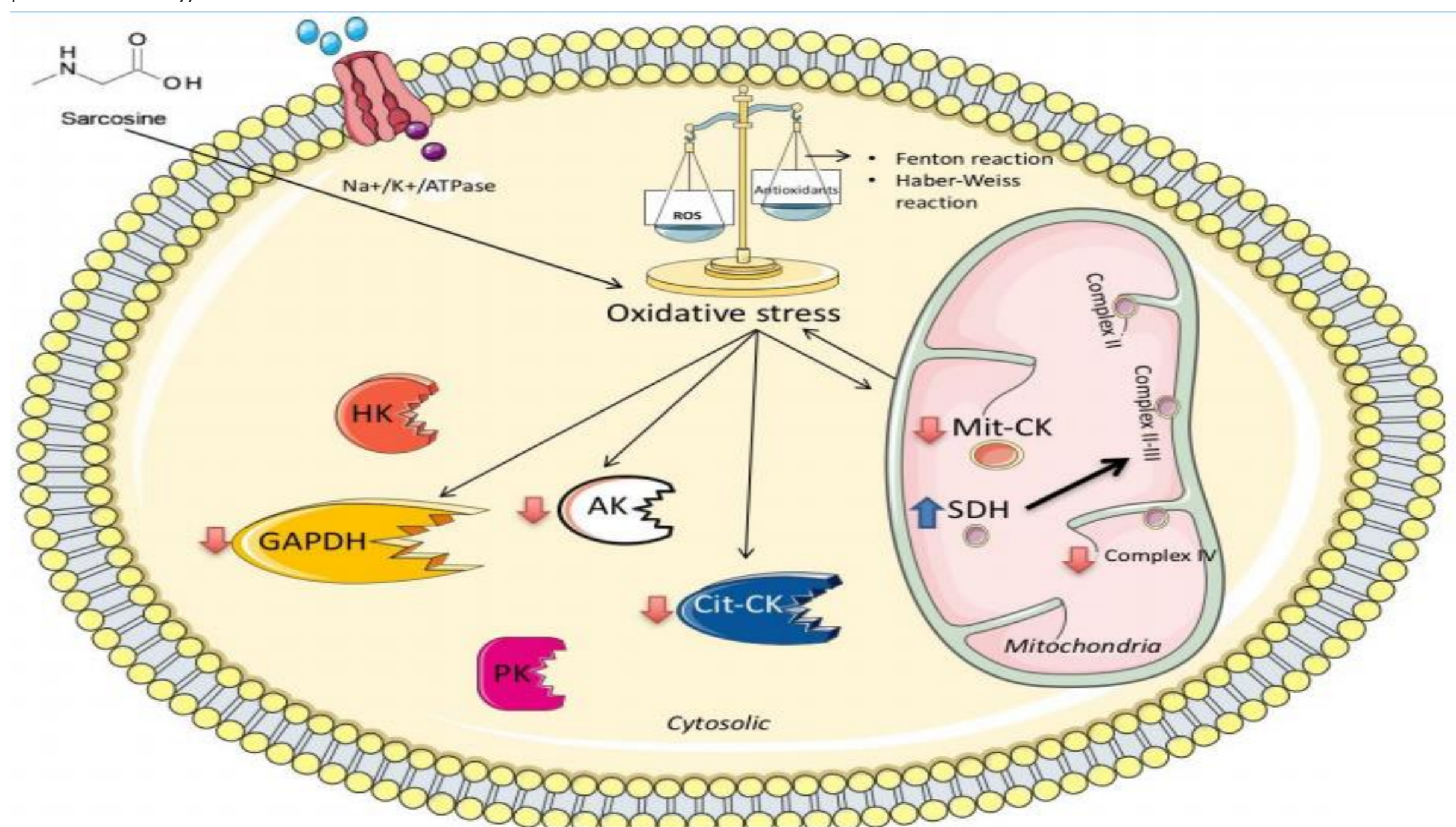


Fig. 5. Esquema dos possíveis mecanismos desencadeados pelo estresse oxidativo sobre a inibição de enzimas do metabolismo energético pela sarcosina discutido no texto. A figura foi produzida usando Servier Medical Art (www.servier.com)

A atividade da hexoquinase, PK e Na⁺-K⁺-ATPase não foram modificadas pela administração aguda ou não de sarcosina.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a creatina mais piruvato foi capaz de evitar perturbações bioenergéticas como as inibições das enzimas da rede fosforiltransferência e de estresse oxidativo pela sarcosina, sugerindo que a creatina mais piruvato podem ter um papel protetor no cérebro. Tais dados são muito encorajadores, uma vez que a suplementação de creatina e piruvato poderá vir a se constituir em uma boa alternativa terapêutica para pacientes com sarcosinemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gerritsen T, Waisman HA (1966) Hypersarcosinemia: an inborn error of metabolism. N Engl J Med 275:66-9; Bergeron F, Otto A, Blache P, Day R, Denoroy L, Brandsch R, Bataille D (1998) Molecular cloning and tissue distribution of rat sarcosine dehydrogenase. Eur J Biochem 257:556-561; Scott CR (2001) Sarcosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8 th edn. McGraw-Hill Companies, New York, pp 2057-206; Socala K, Nieoczym D, Rundfeldt C, Wlaz P (2010) Effects of sarcosine, a glycine transporter type 1 inhibitor, in two mouse seizure models. Pharmacol Rep 62:392-397; Mazzola JL, Sirover MA (2005) Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization. Biochim Biophys Acta 1722:168-74; Leong SF, Lai JC, Lim L et al (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. J Neurochem 36:1548-56; Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM et al (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. Circ Res 84:1137-43; Huges BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase. Clin Chim Acta 7:597-603; Rustin P, Chretien D, Bourgeois T, et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 228:35-51; Sorensen RG, Mahler HR (1982) Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal. J Bioenerg Biomembranes 14:527-547; Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 302:141-145; LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy BS (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 5:227-31; Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (eds) Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press Inc, Boca Raton, 1985, pp 243-7.