

Mateus Grings<sup>1</sup>, Anelise Miotti Tonin<sup>1</sup>, Ângela Zanatta<sup>1</sup>, Lisiane Aurélio Knebel<sup>1</sup>, Alana Pimentel Moura<sup>1</sup>, Guilhian Leiphitz<sup>1</sup>, Moacir Wajner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

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

grings\_np@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O ácido fitânico (Fit) é um ácido graxo saturado de cadeia ramificada que encontra-se acumulado na doença de Refsum. A doença de Refsum é uma doença de herança autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima fitanoil-CoA hidroxilase, a qual participa da  $\alpha$ -oxidação peroxissomal de ácidos graxos ramificados. O bloqueio dessa rota leva ao acúmulo do Fit nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, podendo atingir concentrações de até 5000  $\mu$ M no plasma (níveis plasmáticos em indivíduos normais: 5  $\mu$ M).

Clinicamente, os portadores dessa doença apresentam predominantemente sintomas neurológicos, além de cardiomiopatia, que se constitui em uma das principais causas de morte desses indivíduos [1].

## OBJETIVOS

Considerando que a fisiopatologia da cardiomiopatia encontrada em portadores da doença de Refsum não está estabelecida, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos *in vitro* do Fit sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em coração de ratos jovens.

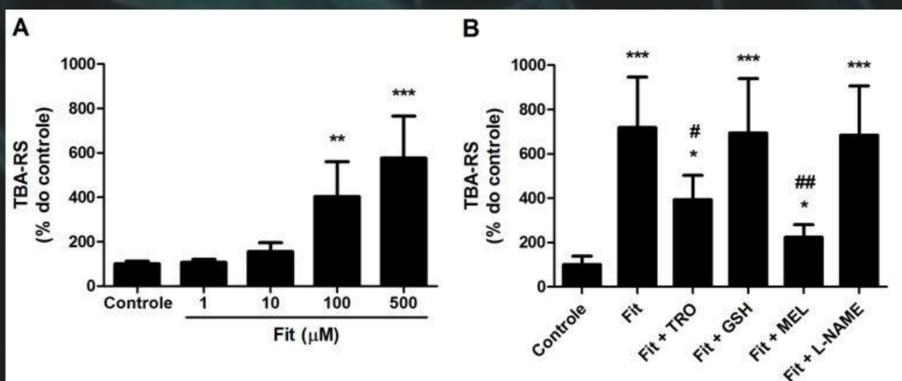
## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados os seguintes parâmetros de estresse oxidativo em sobrenadantes ou fatias de coração de ratos Wistar de 30 dias de vida:

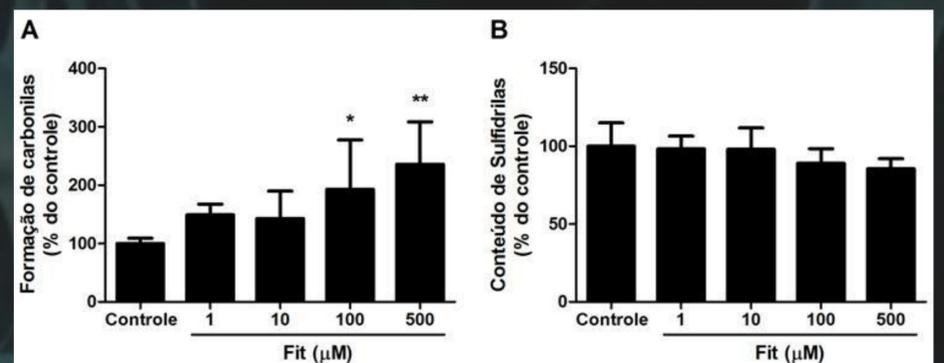
- Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) [2];
- Formação de grupamentos carbonila [3];
- Oxidação de grupamentos sulfidríla [4];
- Níveis de glutatona reduzida (GSH) [5];
- Oxidação da diclorofluorescina (DCFH) [6].

## RESULTADOS

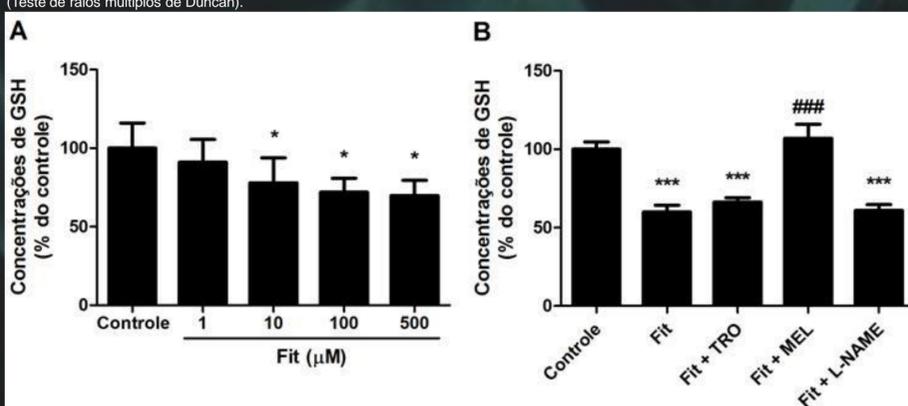
Observou-se que o Fit aumentou significativamente os níveis de TBA-RS (oxidação lipídica) (Figura 1A) em coração de ratos, sendo este efeito atenuado por trolox (TRO) e melatonina (MEL) (Figura 1B). O Fit também induziu dano proteico, como evidenciado pelo aumento na formação de carbonilas (Figura 2A). Já a oxidação de grupamentos sulfidríla não foi significativamente alterada pelo metabólito (Figura 2B). Por outro lado, o Fit diminuiu os níveis de GSH, uma importante defesa antioxidante não-enzimática (Figura 3A), sendo este efeito totalmente prevenido pela MEL (Figura 3B). Além disso, o Fit aumentou a produção de espécies reativas, como evidenciado pelo aumento na oxidação do DCFH (Figura 4).



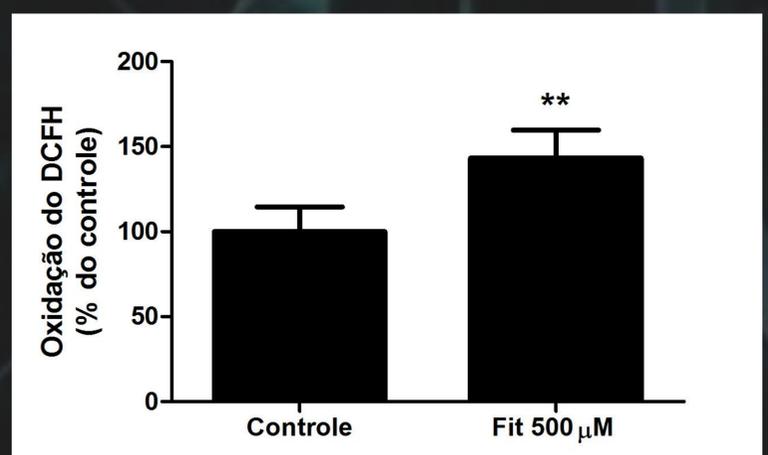
**Figura 1.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu$ M) (A). Em alguns experimentos foram utilizados os antioxidantes trolox (TRO; 10  $\mu$ M), glutatona reduzida (GSH; 1500  $\mu$ M), melatonina (MEL; 1500  $\mu$ M) e N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME; 500  $\mu$ M) com o objetivo de avaliar os efeitos desses compostos sobre o aumento da peroxidação lipídica (TBA-RS) induzida pelo Fit em sobrenadante de coração de ratos jovens (B). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: níveis de TBA-RS [nmol/mg proteína]); (A): 0,25  $\pm$  0,03; (B): 0,26  $\pm$  0,09. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, comparado aos controles; #P < 0,05, ##P < 0,01, comparado ao Fit 500  $\mu$ M (Teste de raios múltiplos de Duncan).



**Figura 2.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a formação de grupamentos carbonila (A) e oxidação de grupamentos sulfidríla (B) em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu$ M). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: formação de carbonilas [nmol/mg de proteína] (A): 0,60  $\pm$  0,06; conteúdo de sulfidrílas [nmol/mg de proteína] (B): 39,97  $\pm$  5,99). \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, comparado aos controles (Teste de raios múltiplos de Duncan).



**Figura 3.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em coração de ratos jovens. O sobrenadante de coração foi incubado na ausência (controle) ou na presença de Fit (1-500  $\mu$ M) (A). Em alguns experimentos foram utilizados os antioxidantes trolox (TRO; 10  $\mu$ M), melatonina (MEL; 500  $\mu$ M) e N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME; 500  $\mu$ M) com o objetivo de verificar os efeitos desses compostos sobre a diminuição das concentrações de GSH causada pelo Fit em sobrenadante de coração de ratos jovens (B). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controles: níveis de GSH [nmol/mg proteína]); (A): 2,74  $\pm$  0,44; (B): 5,69  $\pm$  0,65). \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001, comparado aos controles; ###P < 0,001, comparado ao Fit 500  $\mu$ M (Teste de raios múltiplos de Duncan).



**Figura 4.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a oxidação da diclorofluorescina (DCFH) em coração de ratos jovens. Fatias de coração foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de Fit (500  $\mu$ M). Os valores estão representados em média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em porcentagem do controle (Controle: formação de DCF [pmol/g de tecido]: 19,60  $\pm$  7,18). \*\*P < 0,01, comparado ao controle (Teste de raios múltiplos de Duncan).

## CONCLUSÕES

O presente estudo indica que o Fit induz dano oxidativo lipídico e proteico e diminui as defesas antioxidantes em coração de ratos jovens *in vitro* através da geração de espécies reativas. Portanto, pode-se presumir que o estresse oxidativo induzido pelo Fit pode contribuir, ao menos em parte, para a cardiomiopatia apresentada pelos portadores da doença de Refsum.

## REFERÊNCIAS

- [1] Wanders, *Gene Reviews* (1993:2006)
- [2] Yagi, *Methods Mol Biol* 108(1998):107-110.
- [3] Reznick e Packer, *Meth Enzymol* 233(1994):357-363;
- [4] Aksenov e Markesbery, *Neurosci Lett* 302(2001):141-145;
- [5] Browne e Armstrong, *Methods Mol Biol* 108(1998):347-352;
- [6] Lebel, Ischiropoulos e Bondy, *Chem Res Toxicol* 5(1992):227-231.