

Fernanda dos Santos Petry<sup>1</sup>, Fernando Kreutz<sup>1</sup>, Melissa Camassola<sup>2</sup>, Ana Carolina Breier<sup>1</sup>, Pedro Chagastelles<sup>3</sup>, Vanessa Schein<sup>1</sup>, Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma<sup>1</sup>, Nance Beyer Nardi<sup>2</sup> e Vera Maria Treis Trindade<sup>1</sup>.  
(<sup>1</sup>Dep. Bioquímica - ICBS - UFRGS; <sup>2</sup>ULBRA; <sup>3</sup>Dep. Genética - IB - UFRGS)  
fernanda.petry@ufrgs.br

## INTRODUÇÃO

A mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença de depósito lisossomal caracterizada pela deficiência da enzima  $\alpha$ -L-iduronidase (IDUA), o que gera acúmulo cerebral dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfato<sup>(1,2)</sup>. Os mecanismos pelos quais o acúmulo de GAGs gera os danos neurológicos característicos da patologia ainda são desconhecidos. Dados sugerem que o acúmulo destes compostos afete a atividade de enzimas de degradação de gangliosídeos, alterando a composição lipídica de membranas neurais<sup>(3)</sup>. Gangliosídeos são glicosfingolípídios contendo ácido siálico. Presentes em abundância em membranas neurais, apresentam funções sinalizatórias, participando de processos de maturação neural, mielinização, sinaptogênese, transmissão sináptica, e de mecanismos de neuroproteção e apoptose. Desta forma, alterações em seu conteúdo, perfil ou distribuição podem ter participação no desencadear dos danos neurológicos da MPS I.

## OBJETIVOS

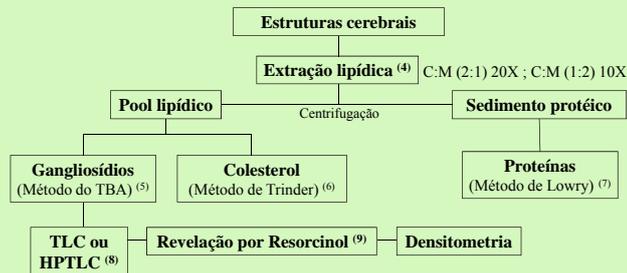
Avaliar o conteúdo, o perfil e a distribuição de gangliosídeos, bem como os níveis de colesterol em diferentes regiões cerebrais (córtex, cerebelo, hipocampo e hipotálamo) em um modelo murino de MPS I.

Avaliar a expressão dos genes das enzimas de síntese de gangliosídeos (GM3, GD3 e GM2/GD2 sintases) e da enzima de degradação neuraminidase 1 (Neu1) em cerebelo e hipocampo, a fim de elucidar as alterações lipídicas observadas.

## METODOLOGIA

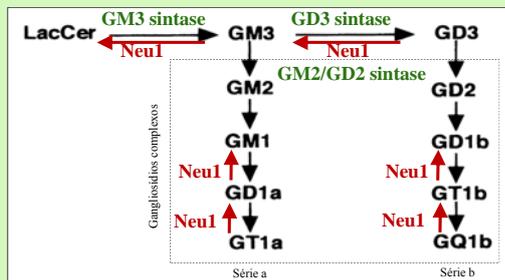
### AVLIAÇÃO DOS NÍVEIS E DA DISTRIBUIÇÃO DE GANGLIOSÍDIOS

Foram utilizados um grupo de camundongos C57BL/6 knock-out (KO) para o gene da IDUA e um grupo selvagem (WT), ambos de 5 meses.



### AVLIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE GANGLIOSÍDIOS

A expressão gênica das enzimas GM3, GD3, GM2/GD2 sintases e Neu1 foi avaliada em cerebelo e hipocampo por sq-RT-PCR.

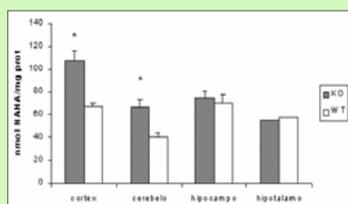


**Figura 1: Metabolismo celular de gangliosídeos:** As enzimas chaves de síntese (verde) e degradação (vermelho) dos gangliosídeos estão representadas. GM3 e GD3 sintases catalisam a síntese dos primeiros gangliosídeos (GM3 e GD3), ao passo que a GM2/GD2 sintase, cuja expressão acompanha o desenvolvimento do SNC, regula a síntese dos gangliosídeos complexos. A relação entre GD3 sintase/GM2-GD2 sintase determina a síntese das séries a e b dos gangliosídeos. A neuraminidase 1 (Neu1) figura como principal enzima de degradação de esfingolípídios contendo ácido siálico terminal.

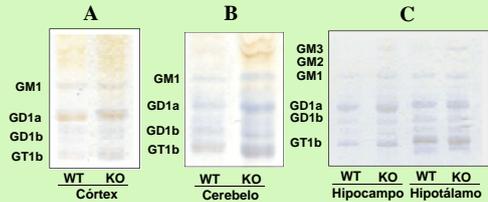
## ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por teste t de Student.

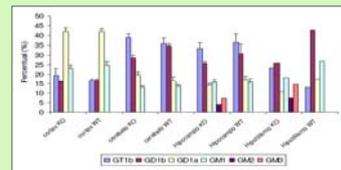
## RESULTADOS



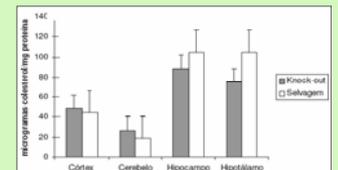
**Figura 2: Conteúdo total de gangliosídeos nas diferentes estruturas cerebrais analisadas.** Em córtex e cerebelo observou-se aumento no conteúdo total de gangliosídeos. KO: knock-out; WT: selvagem. (\*) Significativamente diferente do grupo selvagem. Histogramas representam média  $\pm$  D.P. p < 0,05, n=7.



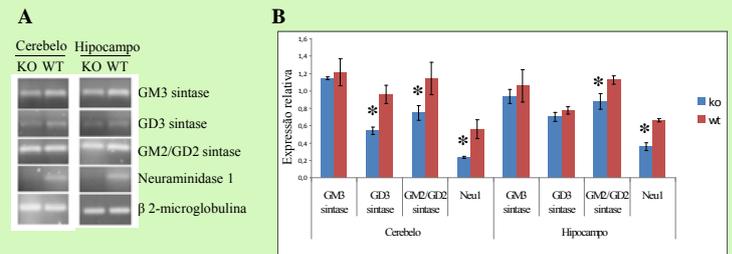
**Figura 3: Perfil cromatográfico de gangliosídeos.** O perfil de gangliosídeos foi avaliado por TLC ou HPTLC em (A) córtex; (B) cerebelo; (C) hipocampo e hipotálamo. Os principais gangliosídeos (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) foram identificados nas estruturas cerebrais avaliadas tanto no grupo KO quanto no WT. Em córtex e cerebelo não foi observada diferença no perfil de gangliosídeos, já no hipocampo e hipotálamo o perfil foi afetado no grupo KO, com a identificação dos gangliosídeos GM3 e GM2. Imagens representativas de 5 diferentes experimentos. WT: selvagem; KO: knock-out.



**Figura 4: Distribuição percentual das diferentes espécies gangliosídicas por densitometria.** Nenhuma diferença significativa na distribuição de gangliosídeos foi observada. KO: knock-out; WT: selvagem. Histogramas representam média  $\pm$  D.P. n=7.



**Figura 5: Conteúdo de colesterol nas estruturas cerebrais analisadas.** Nenhuma diferença significativa foi observada. Histogramas representam média  $\pm$  D.P. n=7.



**Figura 6: Expressão relativa dos genes de metabolismo de gangliosídeos.** (A) Imagem representativa dos géis do sq-RT-PCR; (B) Quantificação das bandas de PCR. Duas estruturas foram avaliadas: cerebelo, que apresentou aumento no conteúdo de todos os gangliosídeos; e hipocampo, que embora não tenha sofrido alteração no conteúdo de gangliosídeos, teve seu perfil alterado, com acúmulo de GM3 e GM2. KO: knock-out; WT: selvagem. (\*) Significativamente diferente do grupo selvagem, p<0,05. Dados representam média  $\pm$  E.P. n=4.

## CONCLUSÕES

- Observou-se nos animais KO, aumento no conteúdo total de gangliosídeos de forma seletiva para córtex e cerebelo e aumento de GM3 e de GM2 em hipocampo e hipotálamo.
- Os níveis de colesterol não foram afetados.
- No cerebelo, houve redução na expressão de Neu1, GD3 sintase e GM2/GD2 sintase; e no hipocampo, redução de Neu1 e de GM2/GD2 sintase.
- Nossos dados sugerem que as alterações lipídicas observadas sejam decorrentes de um efeito conjunto sobre a degradação e biossíntese de gangliosídeos, possivelmente em decorrência do acúmulo de GAGs.
- O acúmulo de GM3 pode ser um indicio de retardo no desenvolvimento neural, visto que este gangliosídeo é expresso majoritariamente no SNC embrionário, ou pode estar envolvido diretamente com o dano neurológico por induzir apoptose<sup>(10,11)</sup>.
- As alterações lipídicas descritas podem estar relacionadas com a fisiopatologia da MPS I, o que fortalece a idéia de que a análise de gangliosídeos poderia servir como parâmetro bioquímico para estudo de dano e/ou neuroproteção no presente modelo.

## REFERÊNCIAS

- Zheng Y, Rozengurt N, Ryazantsev S, Kohn DB, Stake N and Neufeld EF. Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. Mol Genet Metab 79:233-244, 2003;
- Liu Y, Xu L, Hennig AK, Kovacs A, Fu A, Chung S, Lee D, Wang B, Herati RS, Ogilvie JM, Cai S-R and Ponder KP. Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. Mol Ther 11: 35-47, 2005;
- McGlynn R, Dobrenis K and Walkley SU. Differential sub cellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. J Comp. Neurol. 480(4):415-26, 2004;
- Folch, J, Leel, M, Sloane-Stanley, G.H. J Biol. Chem. 226, 497 – 509, 1957;
- Skoza, L., Mohos, S. Biochem. J. v. 159 p. 457-462, 1976;
- Bergmeyer, H.U. Cholesterol and Esterified Cholesterol. In Methods of Enzymatic Analysis, vol. 4, second ed. Verlag Chemie, pp. 1890 – 1893, 1974.
- Lowry et al. J. Biol. Chem., v. 193 p. 265-275, 1951;
- Nores, G.A.; Mizutsumari, R. K.; Kremer D. M. J. Chromat. A., 686 :155-157, 1994
- Svennerholm, L., Biochim. Biophys. Acta 24, 604 – 611, 1957;
- Sohn H, Kim YS, Kim HT, Kim CH, Cho WE, Kang HY, Kim NS, Kim CH, Ryu SE, Lee JH, Ko JH. Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. FASEB J. 2006 Jun;20(8):1248-50, 2006;
- Valaperta R, Chigorno V, Basso L, Prinetti A, Bresciani R, Preti A, Miyagi T, Sonnino S. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. FASEB J. 20(8):1227-9, 2006.

## AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS.