

Gilian B. Guerreiro, Carmen Regla Vargas
Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

INTRODUÇÃO

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da atividade do complexo enzimático da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (figura 1). Esse defeito metabólico leva a um acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) leucina (Leu), isoleucina e valina e, também, de seus correspondentes α -cetoácidos, o ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -ceto- β -metilvalérico e o ácido α -cetoisovalérico. As características clínicas da DXB incluem cetoacidose, atraso psicomotor e retardo mental. A L-car é uma substância que desempenha importantes funções metabólicas como o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria e geração de ATP. Alguns estudos apontam que a L-car também desempenha funções de prevenção do estresse oxidativo e está associada ao aumento do status antioxidante de pacientes com erros inatos do metabolismo.

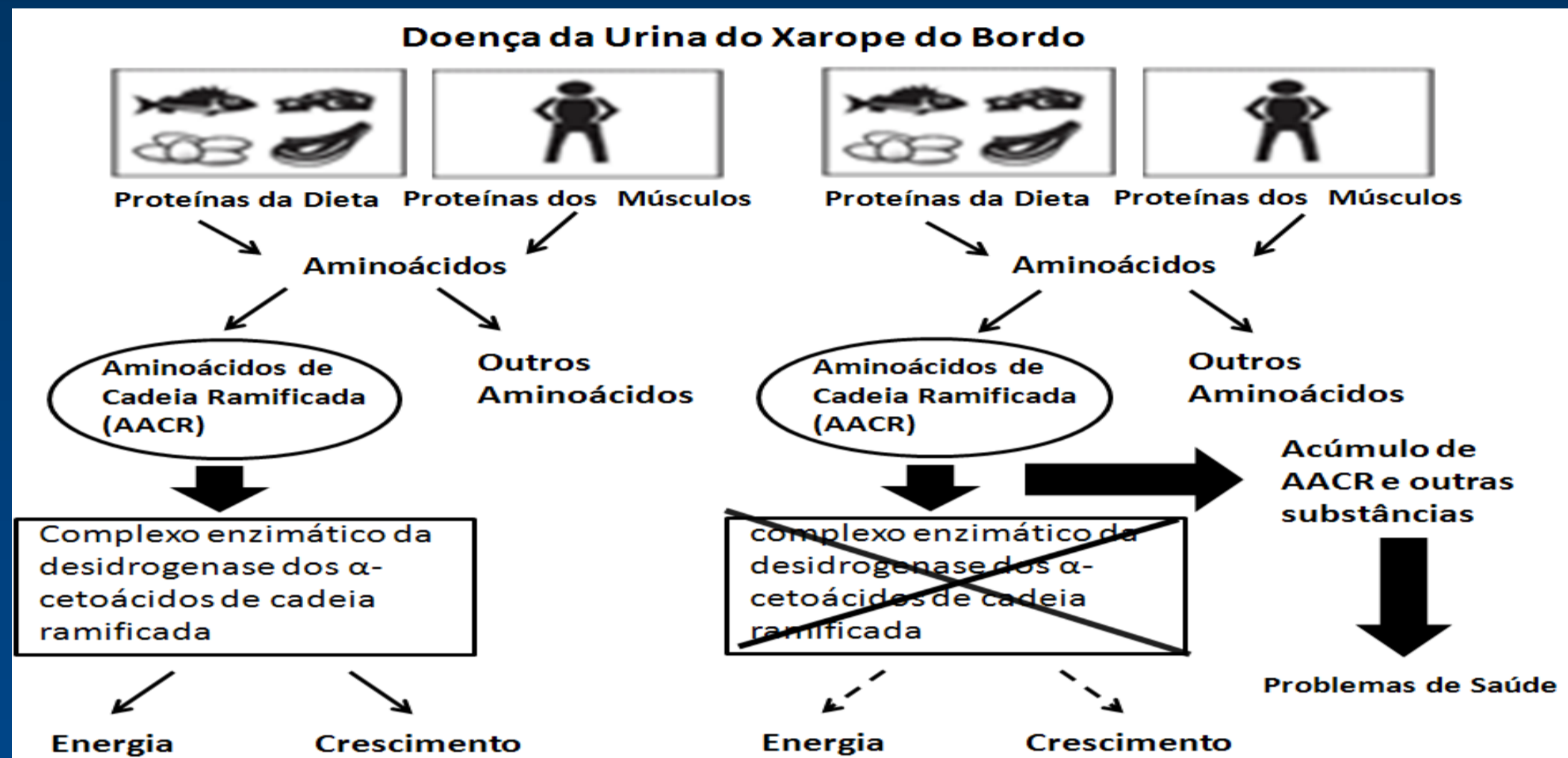


Figura 1: Modelo esquemático da DXB.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* da Leu e do CIC sobre o dano ao DNA e, também, avaliar se a L-car é capaz de proteger frente a esses efeitos, utilizando, para isso, o ensaio cometa em meio alcalino.

METODOLOGIA

Para avaliar o dano ao DNA *in vitro*, foram utilizadas diferentes concentrações de Leu (250, 500, 3000 μ M) e de CIC (60, 150, 2000 μ M) em leucócitos humanos de indivíduos saudáveis. Para avaliação dos efeitos da L-car, os leucócitos foram co-incubados com uma curva de concentração de L-car (30, 60, 90, 120 e 150 μ M).

A incubação ocorreu durante 6 horas a 37^o C conforme metodologia proposta por Singh et al. (1998). A visão global desse ensaio está demonstrada na figura 2. As células foram observadas em microscópio óptico e classificadas de acordo com o tamanho e forma da cauda, onde as classes de dano variam de 0 (nenhuma migração) até 4 (máxima migração). Posteriormente, é atribuído a elas um Índice de Dano (ID) que varia de 0 (todas as células com nenhuma migração) a 400 (todas as células com máxima migração). As lâminas foram analisadas em condições cegas por pelo menos dois analistas diferentes.

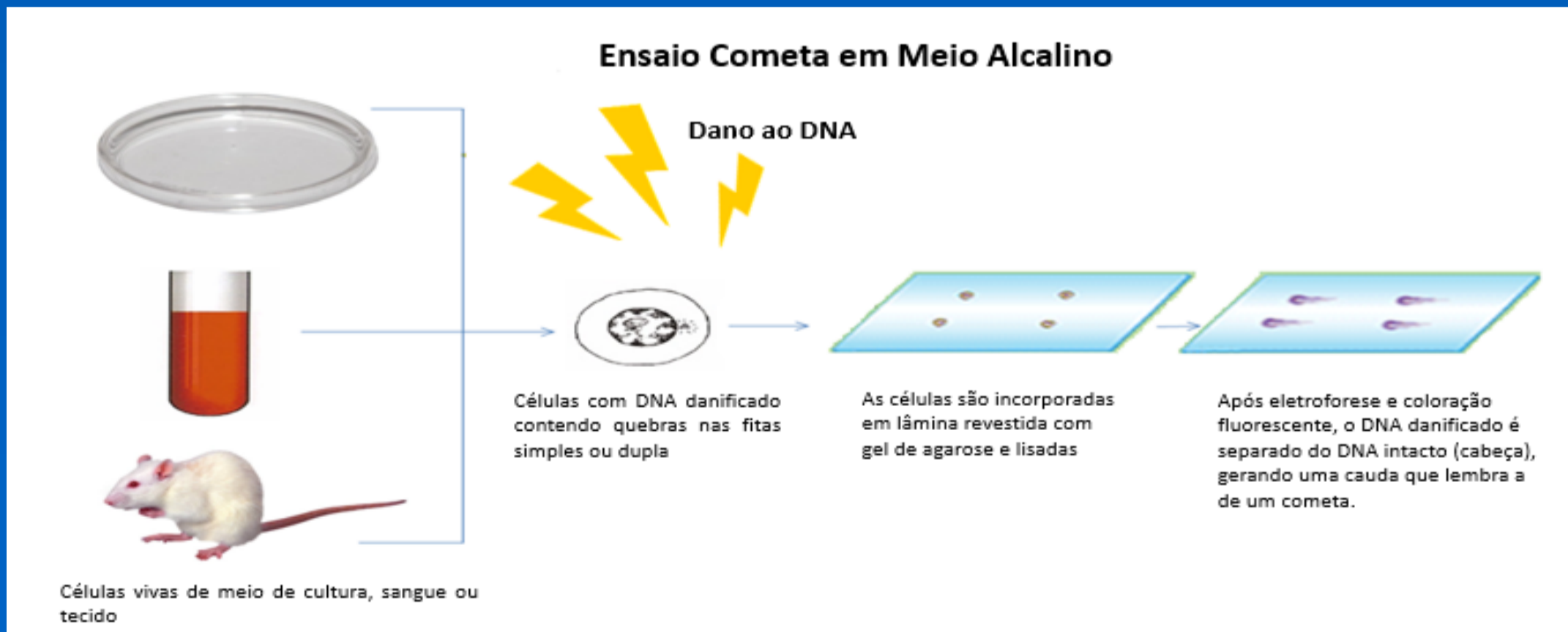


Figura 2 – Visão Global do ensaio cometa

A análise dos dados estatísticos foi feita através do programa SPSS. Foi realizada análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA.

RESULTADOS

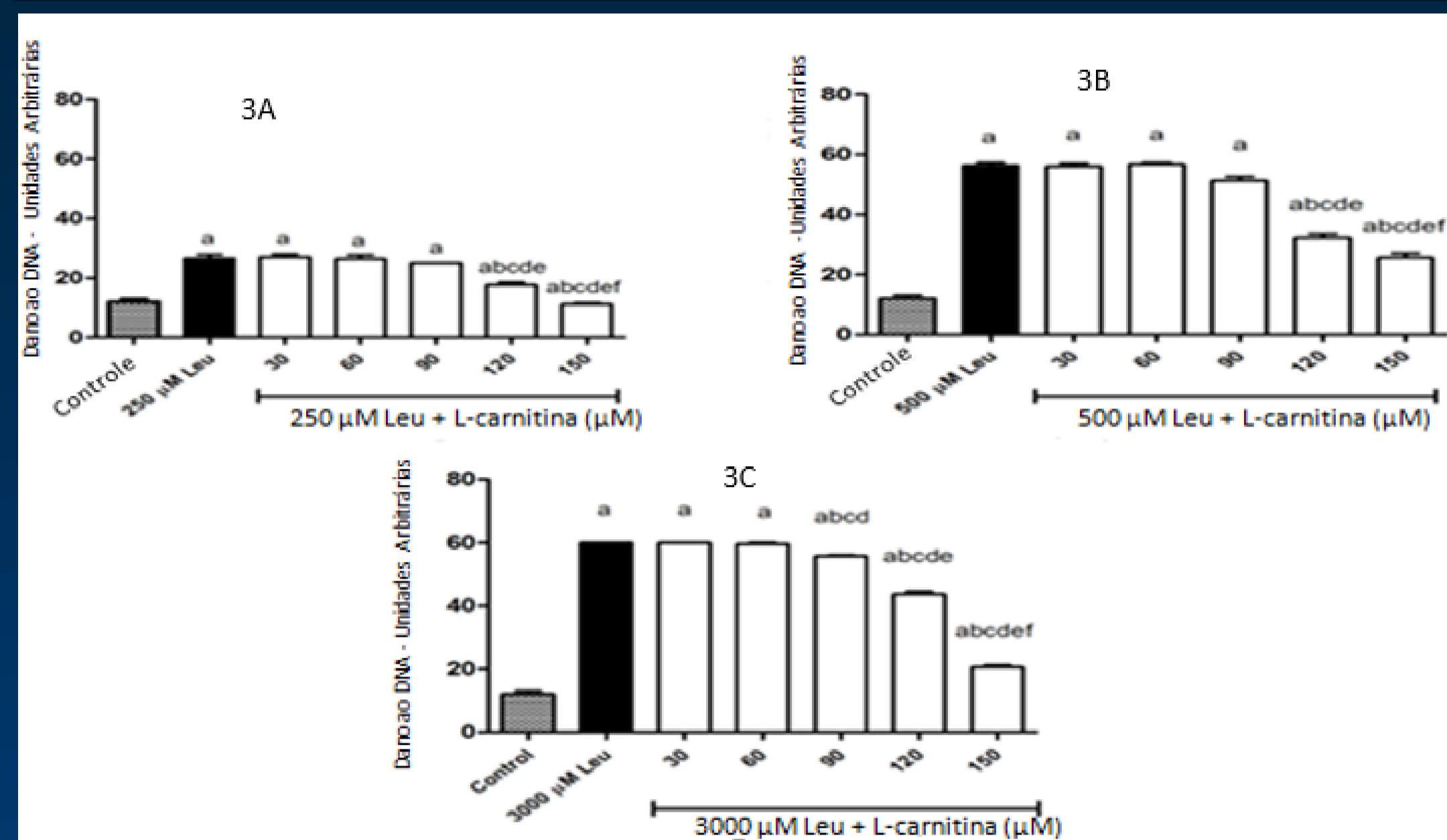


Figura 3 – Efeito *in vitro* da L-car sobre o dano ao DNA induzido por diferentes concentrações de Leucina (250 μ M [3A], 500 μ M [3B], 3000 μ M [3C]). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. [3A]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 250 μ M de Leu; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car; (f) $p < 0,05$ comparado a 120 μ M de L-Car. [3B]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 500 μ M de Leu; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car; (f) $p < 0,05$ comparado a 120 μ M de L-Car. [3C]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 3000 μ M de Leu; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car; (f) $p < 0,05$ comparado a 120 μ M de L-Car.

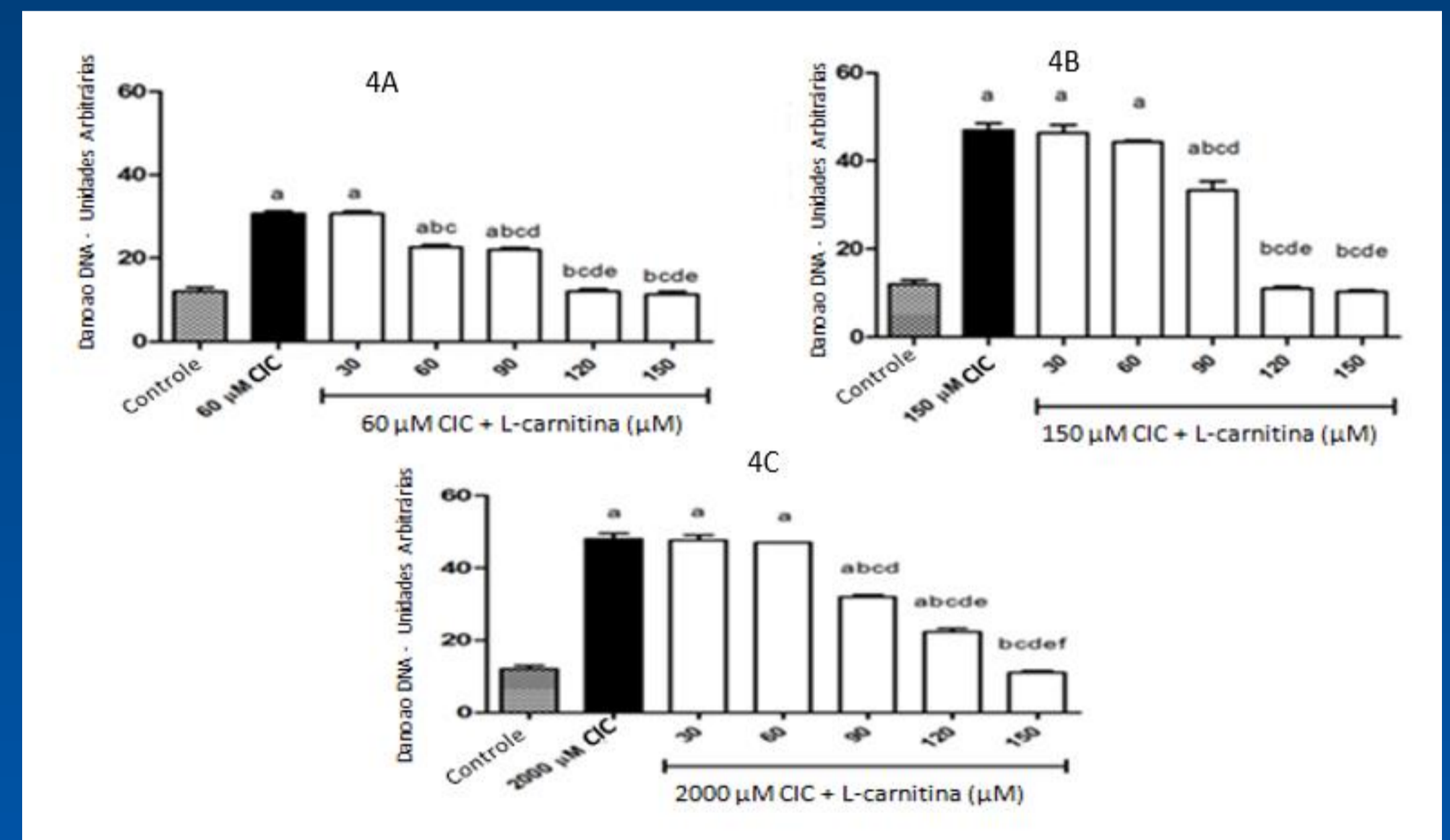


Figura 4 – Efeito *in vitro* da L-car sobre o dano ao DNA induzido por diferentes concentrações de CIC (60 μ M [4A], 150 μ M [4B], e 2000 μ M de CIC [4C]). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. [4A]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de CIC; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car. [4B]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 150 μ M de CIC; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car. [4C]: (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; (b) $p < 0,05$ comparado a 2000 μ M de CIC; (c) $p < 0,05$ comparado a 30 μ M de L-Car; (d) $p < 0,05$ comparado a 60 μ M de L-Car; (e) $p < 0,05$ comparado a 90 μ M de L-Car; (f) $p < 0,05$ comparado a 120 μ M de L-Car.

DISCUSSÃO

As lesões ao DNA podem causar problemas a processos vitais como a transcrição e a replicação celular, resultando em morte da célula ou mutagênese, e estão envolvidas com carcinogênese, envelhecimento, distúrbios genéticos e doenças hereditárias. Em todas as concentrações testadas (250, 500, 3000 μ M de Leu e 60, 150, 2000 μ M de CIC), o índice de dano ao DNA foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle, tanto para Leu como para o CIC, mostrando que estes metabólitos podem induzir a danos ao DNA *in vitro*. Além disso, a L-car nas concentrações mais elevadas, foi capaz de reduzir o índice de dano ao DNA exercendo maior efeito inibitório sobre CIC quando comparado às mesmas concentrações de Leu. Na figura 3, foi observado que as concentrações de L-car de 90, 120 e 150 μ M foram capazes de prevenir o dano ao DNA em relação ao controle. Na figura 4, foi observado que a partir de 120 μ M, a L-car foi capaz de reverter os danos causados por CIC a nível de controle.

CONCLUSÃO

Estes resultados podem contribuir para a compreensão dos efeitos citotóxicos do mecanismo de ação dos metabólitos acumulados na DXB, mostrando evidências do papel do estresse oxidativo na fisiopatologia desta doença e do efeito protetor da L-car sobre o dano ao DNA, podendo abrir uma nova abordagem terapêutica, pois a terapia atual consiste em restrição dietética de proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barschak AG, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006) Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab Brain Dis* 21:279–286
- Chuang DT, Shih VE (2001) Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudt AL, Sly WL, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1971–2005
- Halliwell B, Gutteridge MC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press Inc., New York
- Mescka CP, Wayhs CA, Vanzin CS, Biancini GB, Guerreiro G, Manfredini V, Souza C, Wajner M, Dutra-Filho CS, Vargas CR (2013) Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. *Int J Dev Neurosci* 31(1):21–24.
- Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF (2003) Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochem Biophys Acta* 1639:232–238