

EFEITOS DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS ACUMULADOS NA ACIDÚRIA 3-HIDRÓXI-3-METILGLUTÁRICA SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NEURAIS DO CITOESQUELETO EM CÉREBRO DE RATOS

Gilberto Machado Soares¹ e Moacir Wajner¹.

¹ Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Introdução

A acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (A3HMG) é uma doença neurometabólica bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo dos ácidos 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG), 3-metilglutárico (MGA) e 3-metilglutacônico (MGT) em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Os indivíduos afetados por essa doença apresentam predominantemente encefalopatia com edema cerebral e anormalidades nos gânglios da base. Apesar da predominância de sintomas neurológicos os patomecanismos envolvidos nessa doença ainda não estão totalmente elucidados.

Objetivo

Tendo em vista a similaridade estrutural dos compostos acumulados na A3HMG com o glutamato e que os receptores do tipo NMDA são responsáveis pela ativação de várias rotas de sinalização envolvendo a homeostase do sistema de fosforilação, avaliamos os efeitos *in vitro* dos ácidos HMG, MGT e MGA na fosforilação de proteínas do citoesqueleto em estriado e córtex cerebral de ratos jovens.

Material e Métodos

Fatias de córtex e estriado de ratos de 30 dias foram incubadas com ³²P ortofosfato durante 1 hora a 30°C na presença ou ausência dos ácidos HMG, MGA ou MGT. Com a finalidade de investigar os mecanismos de ação, fatias de estriado foram co-incubadas com HMG mais caliculina (inibidor das fosfatases de proteínas PP1 e PP2A), FK-506 (inibidor da calcineurina), MK-801 (antagonista do receptor glutamatérgico tipo N-metil-D-aspartato - NMDA), ifenprodil (inibidor seletivo da subunidade NR2B do receptor NMDA), BAPTA-AM e EGTA (quelantes de cálcio intra e extracelular), L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), TROLOX (análogo hidrossolúvel da vitamina E) ou N-acetilcisteína (precursor da glutatona reduzida – NAC).

Resultados

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o HMG (Figura 1A e B) quanto o MGA (Figura 1E e F) induziram hipofosforilação dos filamentos intermediários (FIs) em ambas estruturas cerebrais enquanto o MGT (Figura 1C e D) inibiu a fosforilação das subunidades dos FIs apenas no estriado. Além disso foram investigados os mecanismos de ação do HMG, principal metabólito acumulado na doença, no estriado, principal estrutura afetada na doença, sobre a fosforilação dos FIs. Para tanto verificamos que as proteínas fosfatases PP1, PP2A (Figura 2A) e calcineurina (Figura 2B) não estão envolvidas na hipofosforilação causada pelo HMG em estriado de ratos. Contudo podemos verificar que os receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Figura 2C) mais especificamente sua subunidade NR2B (Figura 2D) participam no efeito causado pelo HMG. Além do receptor NMDA verificamos que o Ca²⁺ (Figura 2E) bem como espécies reativas de nitrogênio (Figura 2F) e oxigênio (Figura 2G) participam na hipofosforilação causada pelo HMG em estriado de ratos.

Conclusão

Nossos resultados demonstram que os metabólitos acumulados na A3HMG causaram um desequilíbrio no sistema fosforilante dos FIs. Tendo em vista que a hipofosforilação dessas proteínas tem sido previamente relacionadas a disfunções neuronais em outras patologias do sistema nervoso central podemos presumir, ao menos em parte, que o acúmulo desses metabólitos contribui para o dano neurológico apresentado pelos pacientes acometidos por essa doença.

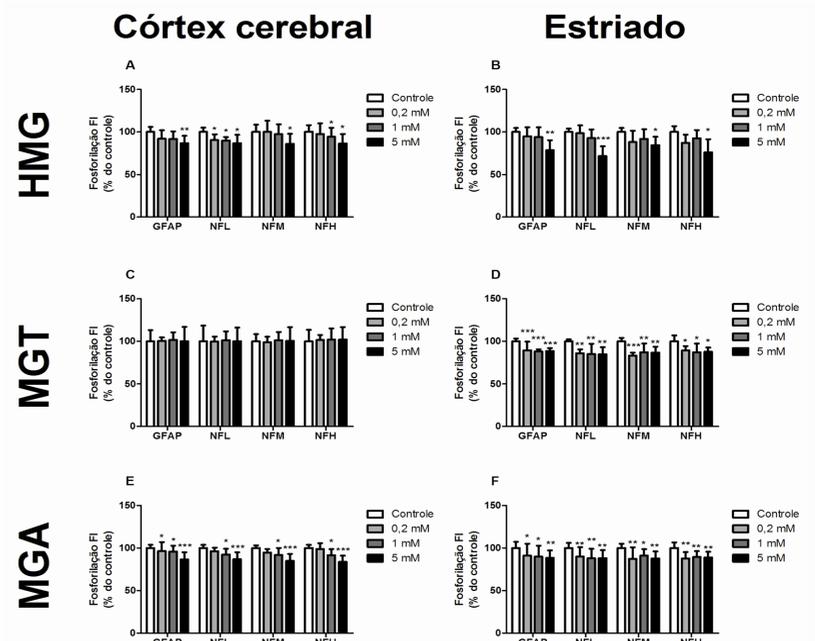


Figura 1 - Efeitos *in vitro* dos ácidos 3-hidroxi-3-metil-glutárico (HMG, A e B), 3-metilglutacônico (MGT, C e D) e 3-metilglutárico (MGA, E e F) na fosforilação das subunidades dos filamentos intermediários (FI) sobre a fração citoesquelética de fatias de córtex cerebral e estriado de ratos de 30 dias. Os valores são médias \pm desvio padrão de doze experimentos independentes realizados em unicata e expressos em porcentagem dos controles (nenhum metabólito adicionado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA seguida pelo teste de Duncan).

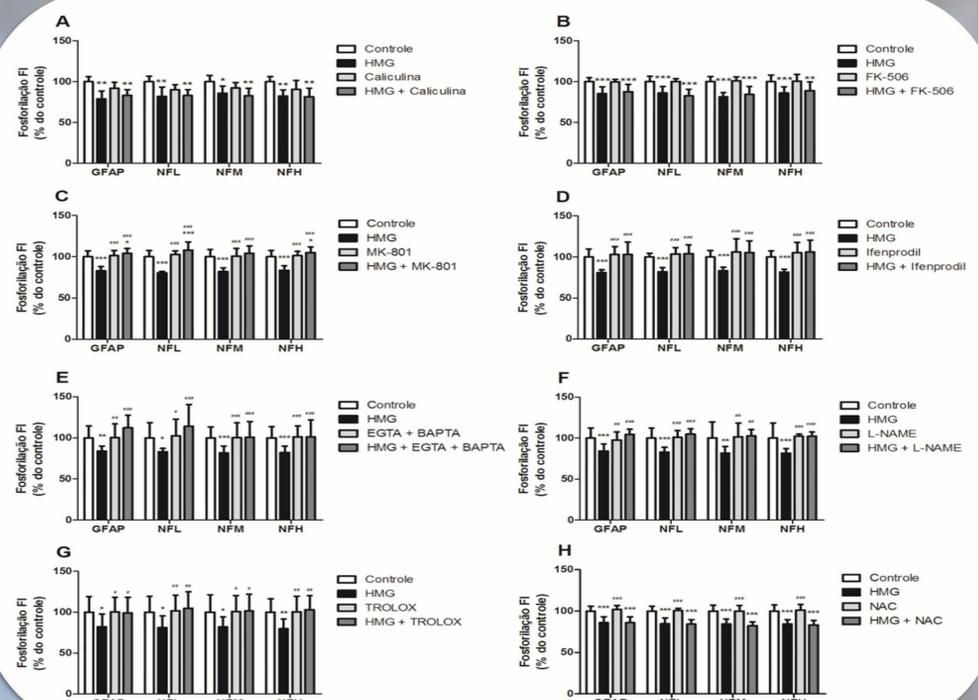


Figura 2 - Efeitos *in vitro* do inibidor das fosfatases de proteínas PP1 e PP2A (caliculina, 0,2 μ M - A), do inibidor da calcineurina (FK-506, 100 μ M - B), do antagonista do receptor NMDA (MK-801, 10 μ M - C), do inibidor da subunidade NR2B do receptor NMDA (Ifenprodil, 10 μ M - D), dos quelantes de cálcio intra e extracelular (BAPTA-AM, 50 μ M e EGTA, 1 mM - E), do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 1mM - F), do análogo hidrossolúvel da vitamina E (TROLOX, 5 μ M - G) e da N-acetil-cisteína (NAC, 1 mM - H) na hipofosforilação das subunidades dos filamentos intermediários induzida pelo ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG, 5 mM) sobre a fração citoesquelética de fatias de estriado de ratos de 30 dias. Os valores são médias \pm desvio padrão de doze experimentos independentes realizados em unicata e expressos em porcentagem dos controles (nenhum metabólito adicionado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA seguida pelo teste de Duncan).