

# Avaliação da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons e do estado REDOX cerebral em zebrafish submetido à crises epilépticas prolongadas.

Gabriela Lazzarotto<sup>1</sup>, Diogo Losch de Oliveira<sup>1</sup>.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Laboratório de neurociência celular e molecular<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada por crises epilépticas recorrentes. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que, durante crises epilépticas prolongadas induzidas por PTZ em zebrafish, ocorre um desacoplamento entre a oxidação de glicose e a síntese de ATP, medido através do consumo de oxigênio. Com o objetivo de entender onde está ocorrendo este desacoplamento, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons e avaliar seu funcionamento em animais submetidos à crises epilépticas prolongadas induzidas por PTZ. Além disso, avaliou-se também o estado oxidante do SNC de zebrafish após crises epilépticas prolongadas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a atividade do complexo I mitocondrial em encéfalo de zebrafish adulto.
- Avaliar o impacto de crises convulsivas prolongadas sobre a atividade do complexo I e o balanço oxidativo.

## METODOLOGIA

Zebrafish adultos (112 animais) foram utilizados (protocolo CEUA – 28043). Grupos controle e tratado (PTZ 10 mM - 20 min) foram anestesiados com tricáina (160 µg/mL) e mortos por decapitação. Seus encéfalos foram removidos e dissecados. As amostras foram dissociadas mecanicamente no tampão HBSS e submetidas ao equipamento Oroboros® (figura 1) para obtenção das medidas de respirometria (2 cérebros/amostra). A respiração máxima foi obtida por adição gradual do desacoplador FCCP (0,1 mM). Para avaliar a atividade do complexo I, foi adicionado rotenona às amostras tratadas com FCCP (n=4). Para avaliar o estado REDOX cerebral foram realizadas as seguintes medidas: potencial antioxidante total (TRAP); atividade da superóxido dismutase (SOD); atividade da catalase (CAT); grupamentos tiol total (-SH); glutatona reduzida (GSH); atividade da glutatona Peroxidase (GPx); e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para tanto, utilizou-se um pool de 5 encéfalos de zebrafish por amostra homogeneizado em tampão PBS (pH 7,4) (n = 8). A proteína foi quantificada por Bradford. A análise estatística foi realizada por teste T (p ≤ 0,05).

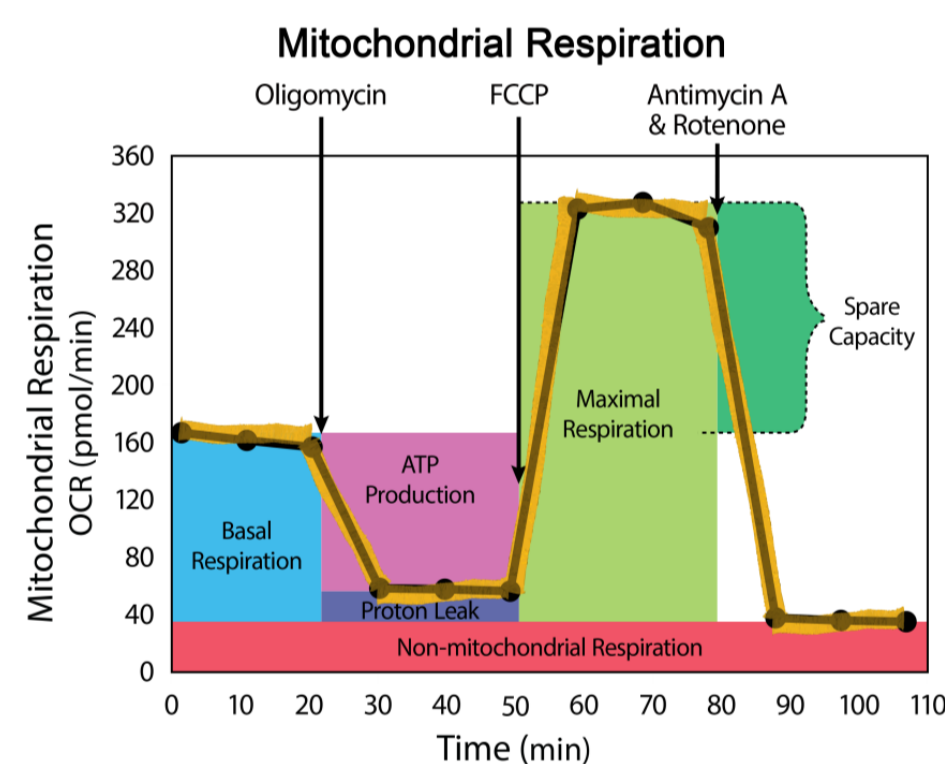


Figura 1: Gráfico ilustrativo referente aos parâmetros fundamentais da função mitocondrial. Respiração basal, produção de ATP, respiração máxima, vazamento de prótons e respiração extramitocondrial.

## RESULTADOS

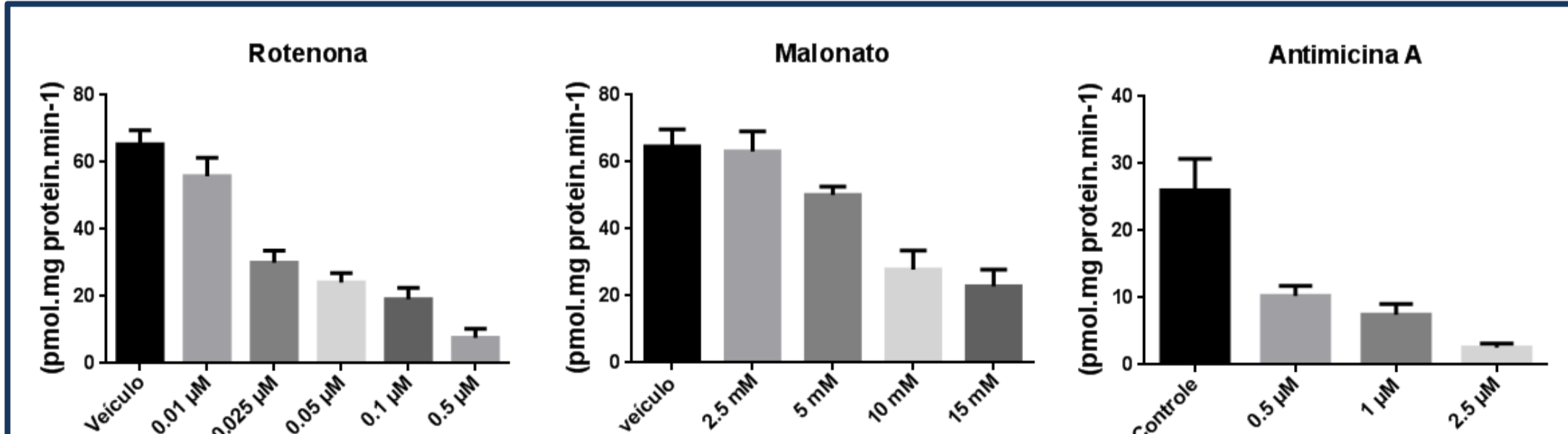


Figura 2: Curva de concentrações de Rotenona, Malonato e Antimicina A e avaliação do consumo de oxigênio em homogenato de cérebro de zebrafish.

Baseado nos resultados obtidos, foram escolhidas as seguintes concentrações de Rotenona (0.05µM), Malonato (10mM) e antimicina A (2.5µM). Os dados estão representados como média + S.E.M. N= 4.

## REFERÊNCIAS

- Mitochondrial dysfunction in epilepsy. Folbergrová J, Kunz WS. Mitochondrion. 2012 Jan;12(1):35-40.
- Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. Smeland OB, Hadera MG, McDonald TS, Sonnewald U, Borges K. J Cereb Blood Flow Metab. 2013 Jul;33(7):1090-7.
- Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. Mussulini BH, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Souza TM, Calcagnotto ME, Campos MM, Battastini AM, de Oliveira DL. PLoS One. 2013;8(1):e54515.
- Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. Bozzo L, Puyal J, Chatton JY. PLoS One. 2013 Aug 12;8(8):e71721.

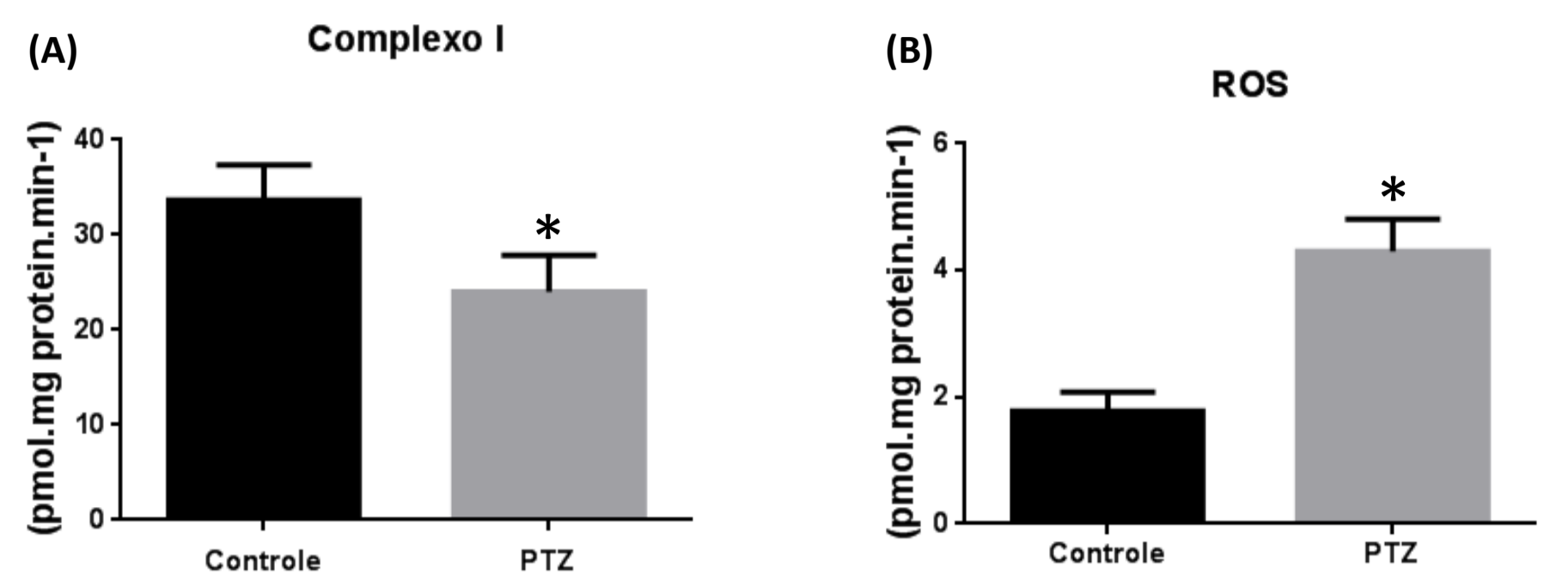


Figura 3: Avaliação da atividade do complexo I da cadeia respiratória e produção de espécies reativas de oxigênio.

(A) A atividade do complexo I diminuiu 33% no grupo PTZ quando comparado ao controle. (B) Houve aumento do consumo de oxigênio para a formação das espécies reativas de oxigênio quando houve completa inibição dos complexos I e III. Os dados estão representados como média + S.E.M e foram analisados pelo Teste-t. O símbolo \* representa diferença estatística (p<0.05). Nos parâmetros A e B utilizou-se n=4.

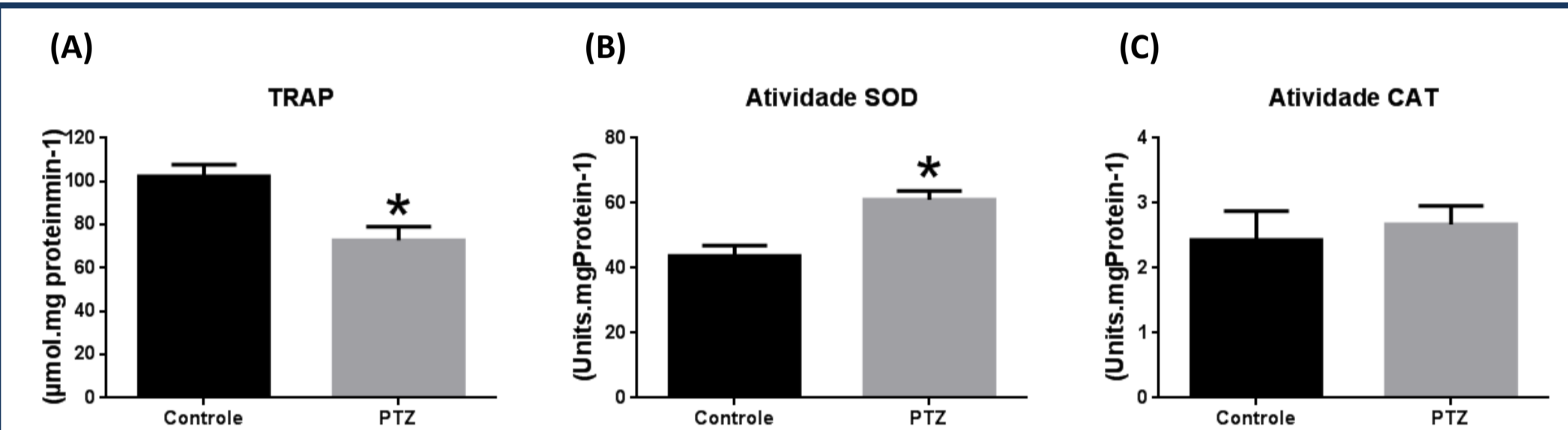


Figura 4: Avaliação do potencial redutor total (TRAP) e da atividade da SOD e CAT.

(A) No grupo PTZ houve uma redução de 25% do potencial antioxidante total (TRAP). (B) A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentou em 30% no PTZ e (C) a atividade da catalase (CAT) permaneceu inalterada. Os dados estão representados como média + S.E.M e foram analisados por Teste-t. \* = p < 0.05. N=8.

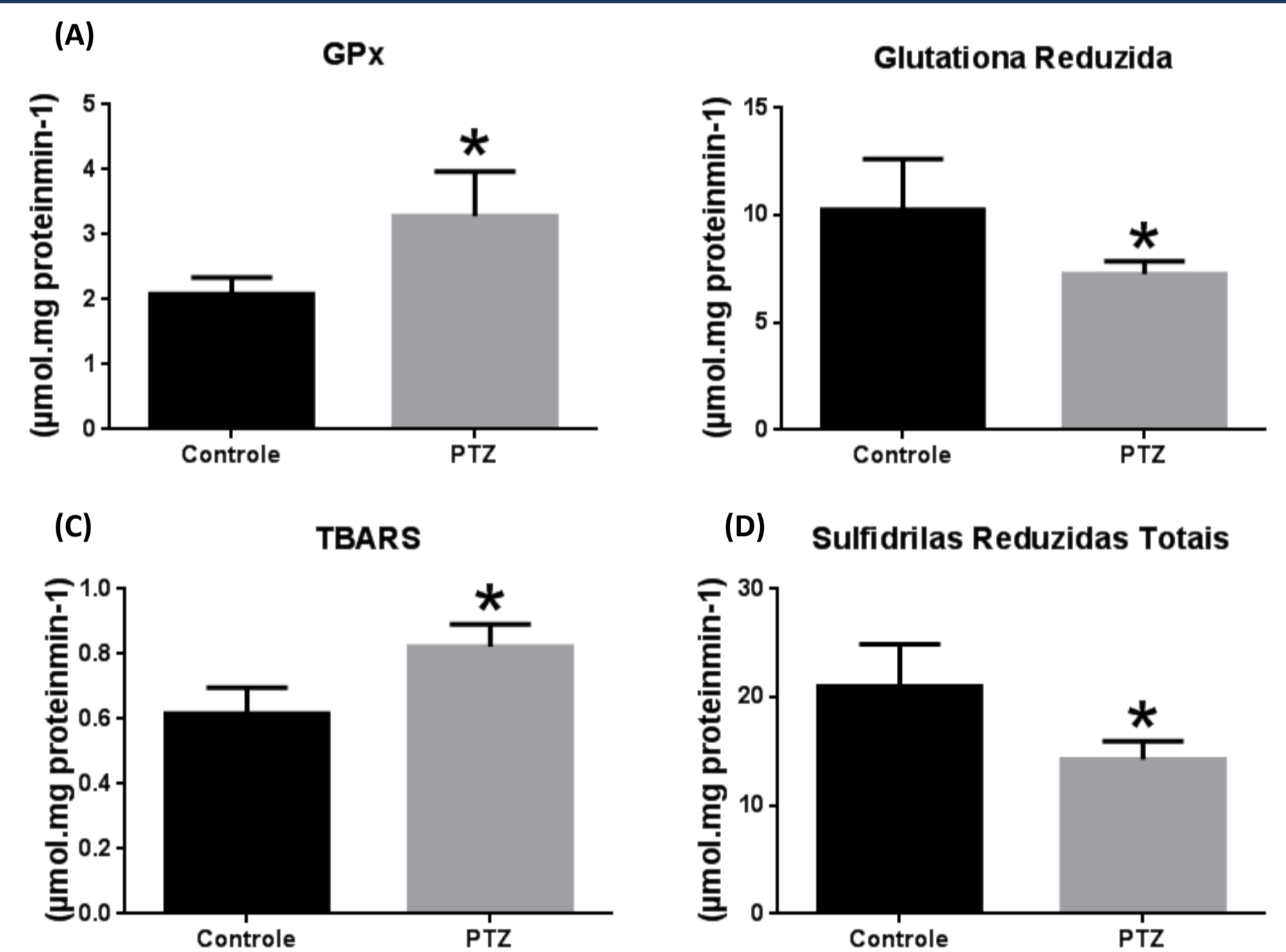


Figura 5: Avaliação da atividade da GPx e medidas da glutatona, TBARS e sulfidril total reduzido.

(A) A atividade da enzima Glutaciona peroxidase (GPx) aumentou em 30%. (B) A Glutaciona reduzida diminuiu em 25%. (C) Houve aumento de 30% na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e (D) houve uma redução de 30% nos grupamentos -SH (sulfidrilas).

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que o complexo I está alterado quando o animal é submetido a crises convulsivas de 20 minutos e que a produção de espécies reativas de oxigênio está aumentada. Esses resultados sugerem que o desacoplamento entre a oxidação da glicose e a produção de ATP pode estar ocorrendo no complexo I. Os danos oxidativos ocorreram quando os animais foram submetidos à crises epilépticas induzidas. Isto é evidenciado através dos resultados do teste TBARS e Sulfidrilas Reduzidas Totais. As enzimas GPx e SOD e o antioxidante Glutaciona são os prováveis mecanismos envolvidos neste estresse oxidativo.

Como perspectiva, pretende-se avaliar a atividade da glutatona redutase, o balanço NADPH/NADP<sup>+</sup> e ATP/ADP, bem como a atividade da via das pentoses fosfato.

## APOIO FINANCEIRO