

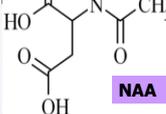
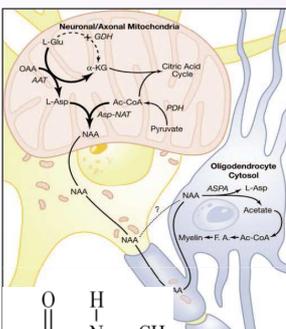
PAPEL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO LIPÓICO CONTRA A TOXICIDADE AGUDA DO ÁCIDO N-ACETILASPÁRTICO

Dalazen, G.R.; Piccoli B.; Cortes M.X.; Pederzoli, C.D.; Dutra-Filho, C.S.

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Departamento de Bioquímica – ICBS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – RS – Brasil

INTRODUÇÃO

O ácido lipóico (AL) é um potente antioxidante que apresenta especificidade na eliminação de espécies reativas, induzindo a expressão de genes importantes na defesa antioxidante, e até certo ponto, reparando o dano celular oxidativo^{1,2,3}. Desta forma, o seu uso foi proposto no tratamento de desordens neurais envolvendo radicais livres.



O ácido N-acetilaspártico (NAA) se acumula na Doença de Canavan, um erro inato do metabolismo severo caracterizado por retardo mental, hipotonia, macrocefalia e crises generalizadas do tipo tônico-clônicas^{4,5}. Essa leucodistrofia é causada pela deficiência da enzima aspartoacilase, que hidrolisa o NAA em acetato e aspartato^{5,6,7}.

Embora os mecanismos de dano cerebral desta doença permaneçam ainda pouco esclarecidos, sabe-se que o NAA apresenta ações neurotóxicas^{8,9,10,11,12}. Além disso, estudos recentes desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa mostraram que o NAA induz estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* em córtex cerebral de ratos^{13,14} demonstrando o papel neurotóxico do NAA.

Considerando que não existe um tratamento específico para a Doença de Canavan, o presente trabalho avalia um possível papel neuroprotetor do ácido lipóico contra a toxicidade aguda do NAA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar de 14 dias de vida foram submetidos a uma administração aguda de 0,6 mmol ácido N-acetilaspártico/Kg de peso corporal, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico (40mg/kg peso corporal) por 2 dias, ou solução salina (controles), e uma hora depois os ratos foram mortos por decapitação. O cérebro foi imediatamente removido, e o córtex cerebral foi dessecado e homogeneizado em 10 volumes (1:10 p/v) com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 140 mM de KCl. Os homogeneizados foram centrifugados a 750xg por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para as medidas de parâmetros de estresse oxidativo: atividades das enzimas antioxidantes **catalase (CAT)**¹⁵ e **glutathione peroxidase (GPx)**¹⁶; **conteúdo de peróxido de hidrogênio**¹⁷; **substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)**¹⁸, para medir a peroxidação lipídica e **conteúdo de carbonilas**¹⁹, para avaliar a oxidação protéica. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry²⁰. Os dados bioquímicos foram analisados pela Análise de Variância de Uma Via (ANOVA) seguida do teste de Tukey, através do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Valores de $p < 0,05$ são considerados significativos.

RESULTADOS

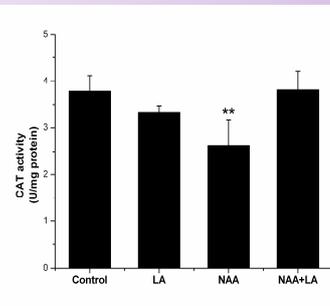


Figura 1. Efeito da administração aguda de ácido N-acetilaspártico, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico, sobre a atividade da catalase (CAT) em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8) para experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ comparados ao controle (teste de Tukey).

Figura 2. Efeito da administração aguda de ácido N-acetilaspártico, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico, sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx) em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8) para experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ comparados ao controle (teste de Tukey).

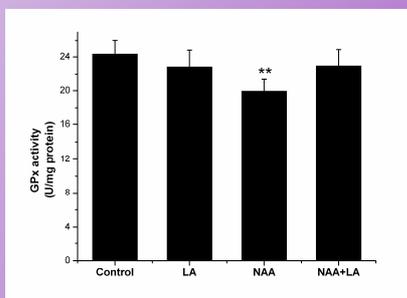


Figura 3. Efeito da administração aguda de ácido N-acetilaspártico, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico, sobre o conteúdo de peróxido de hidrogênio em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8) para experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ comparados ao controle (teste de Tukey).

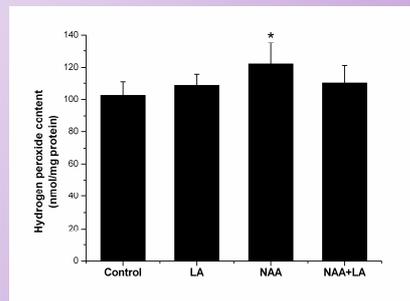


Figura 4. Efeito da administração aguda de ácido N-acetilaspártico, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico, sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8) para experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ comparados ao controle (teste de Tukey).

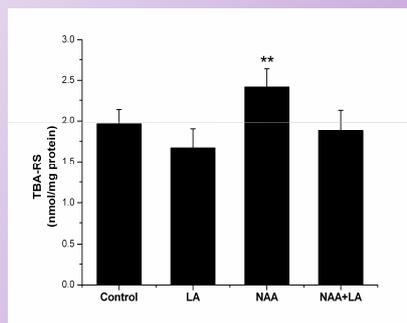
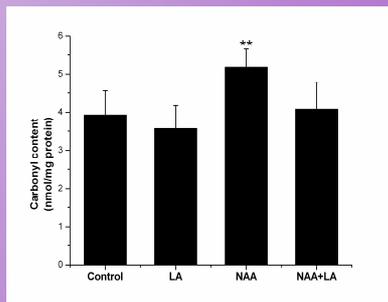


Figura 5. Efeito da administração aguda de ácido N-acetilaspártico, com ou sem pré-tratamento com ácido lipóico, no conteúdo de carbonilas protéicas em córtex cerebral de ratos de 14 dias de vida. Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8) para experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ comparados ao controle (teste de Tukey).



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, demonstramos que as atividades da catalase (Fig. 1) e da glutathione peroxidase (Fig. 2) foram significativamente reduzidas, enquanto o conteúdo de peróxido de hidrogênio (Fig. 3), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Fig. 4) e o conteúdo de carbonilas protéicas (Fig. 5) foram significativamente aumentados pela administração aguda do ácido N-acetilaspártico. Todos os efeitos observados foram prevenidos pelo pré-tratamento com ácido lipóico. O ácido lipóico sozinho não causa efeitos significativos nos parâmetros de estresse oxidativo testados, quando comparado com os controles. Nossos resultados mostram claramente que o ácido lipóico pode proteger contra o estresse oxidativo promovido pelo ácido N-acetilaspártico, indicando um possível papel neuroprotetor do ácido lipóico em condições clínicas onde a concentração de ácido N-acetilaspártico está patologicamente aumentada. Isto pode representar um novo tratamento terapêutico para pacientes afetados pela Doença de Canavan, na qual o ácido N-acetilaspártico se encontra acumulado.

REFERÊNCIAS

- Biewenga *et al.*, 1997. *Gen. Pharm.* 29, 315-331.
- Packer *et al.*, 1995. *Free Radic. Biol. Med.* 19(2), 227-250.
- Bast and Haenen, 2003. *Biofactors* 17, 207-213.
- Traeger and Rapin, 1998. *Pediatric Neurol.* 18(3), 207-212.
- Matalon and Michals-Matalon, 2000. *Frontiers in Bioscience* 5, d307 311.
- Beaudet, 2001. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 5799-5805.
- Madhavarao *et al.*, 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5221-5226.
- Rubin *et al.*, 1995. *Neurosci. Lett.* 198, 209-212.
- Akimitsu *et al.*, 2000. *Brain Res.* 861, 143-150.
- Kitada *et al.*, 2000. *J. Neurochem.* 74(6), 2512-2519.
- Yan *et al.*, 2003. *Epilepsia* 44(9), 1153-1159.
- Klugmann *et al.*, 2005. *Mol. Ther.* 11(5), 745-753.
- Pederzoli *et al.*, 2007. *Int. J. Devl. Neurosci.* 25, 317-324.
- Pederzoli *et al.*, 2009. *Metab. Brain Dis.* 24(2), 283-298.
- Aebi, 1984. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Wendel, 1981. *Meth. Enzymol.* 77, 325-332.
- Pick and Keisari, 1980. *J. Immunol. Meth.* 38, 161-170.
- Ohkawa *et al.*, 1979. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Reznick and Packer, 1994. *Meth. Enzymol.* 233, 357-363.
- Lowry *et al.*, 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-273.

Suporte financeiro: CNPq, FAPERGS, Propesq/UFRGS