

Estudo histológico e da expressão de receptores glutamatérgicos em córtex cerebral e estriado de camundongos nocaute da Acidemia Glutárica tipo I



Pereira, C.C¹; Wajner, M. ^{1,2}
¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ²⁵Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil ³Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS .



Introdução e Objetivos

A Acidemia Glutárica tipo I (AG I) é uma doença autossômica recessiva neurodegenerativa causada pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), que participa da rota de catabolismo dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. O bloqueio dessa rota pelo defeito enzimático leva ao acúmulo predominante dos ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxiglutárico (3-HG) nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, provocando leucoencefalopatia progressiva cortical e degeneração estriatal aguda. (Goodman et al., 1977). A fisiopatologia da AG-I ainda é desconhecida e o papel da excitotoxicidade é controverso. Portanto, no presente estudo avaliamos a histologia e a expressão gênica de receptores glutamatérgicos (rGLU) do tipo NMDA (em córtex cerebral e estriado de camundongos selvagens (*Gcdh*^{+/+}) e nocautes (*Gcdh*^{-/-}) para a enzima GCDH.

Materiais e Métodos

Para avaliar histologicamente os cérebros dos camundongos de 30 e 60 dias de vida, os animais foram sacrificados e as estruturas dissecadas e fixadas em paraformaldeído para sucessivamente passar por etapas de produção da lâmina e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Quanto a avaliação da expressão gênica dos genes que codificam as subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A e NR2B), AMPA (GluR2) e cainato (GluR6), o RNA total foi extraído do córtex cerebral e estriado através do kit RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa, utilizando SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). A expressão do RNA foi quantificada por PCR em tempo real e determinado pelo método $\Delta\Delta$ Ct, de acordo com Livak e Schmittgen (2001), utilizando camundongos nocautes como calibradores. Os valores de expressão do gene alvo foram normalizados pela expressão de controle endógeno da beta-actina utilizando sondas TaqMan (Tabela 01).

Resultados

Nossos resultados demonstraram que houve superexpressão das subunidades dos rGLU do tipo NMDA (NR1, NR2A e NR2B) em córtex cerebral e estriado dos animais de 30 dias (Figura 01), enquanto que nos animais de 60 dias todos os receptores foram superexpressos (NMDA, AMPA e cainato) também em ambas estruturas (Figura 02). Além disso, os animais de 30 dias não apresentaram diferenças estruturais em córtex cerebral e estriado (Figuras 03), enquanto que os animais *Gcdh*^{-/-} de 60 dias apresentaram vacuolizações e neurônios picnóticos no córtex cerebral (Figura 04).

Receptor	Gene	Número de ensaio
NR1	<i>Grin1</i>	Mm00433790_m1
NR2A	<i>Grin2A</i>	Mm00433802_m1
NR2B	<i>Grin2B</i>	Mm00433820_m1
GluR2	<i>Gria2</i>	Mm00442822_m1
GluR6	<i>Grik2</i>	Mm00599860_m1
B-actin	<i>Actb</i>	Mm00607939_s1

Tabela 01. Número de ensaios utilizados para a quantificação relativa de cada uma das subunidades do receptor de glutamato (Applied Biosystems).

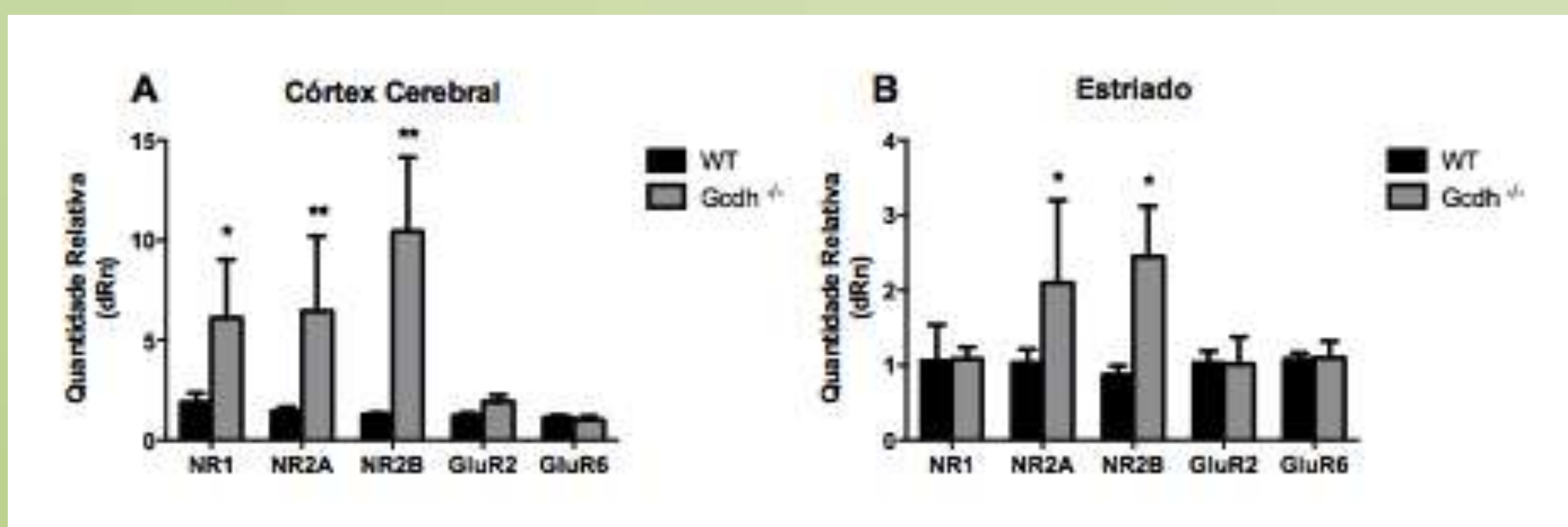


Figura 01. Níveis de expressão de mRNA de receptores glutamatérgicos em córtex cerebral e estriado em camundongos tipo *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-} com 30 dias de vida. A) Córtex Cerebral e B) estriado. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em relação ao *Gcdh*^{+/+} (teste t de Student para amostras não pareadas).

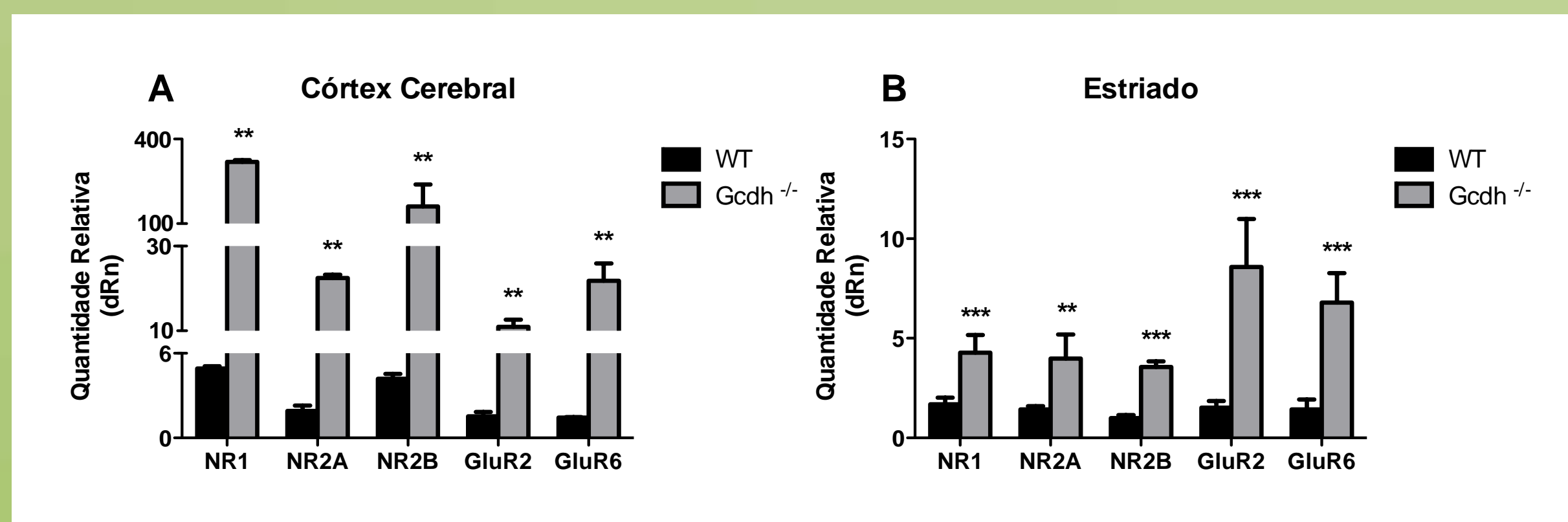


Figura 02. Os níveis de expressão de mRNA de glutamatérgicos no córtex cerebral e estriado em camundongos tipo selvagem *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-} com 60 dias de vida. A) Córtex Cerebral e B) estriado. * $p < 0.01$ e ** $p < 0.001$ em relação ao *Gcdh*^{+/+} (teste t de Student para amostras não pareadas).

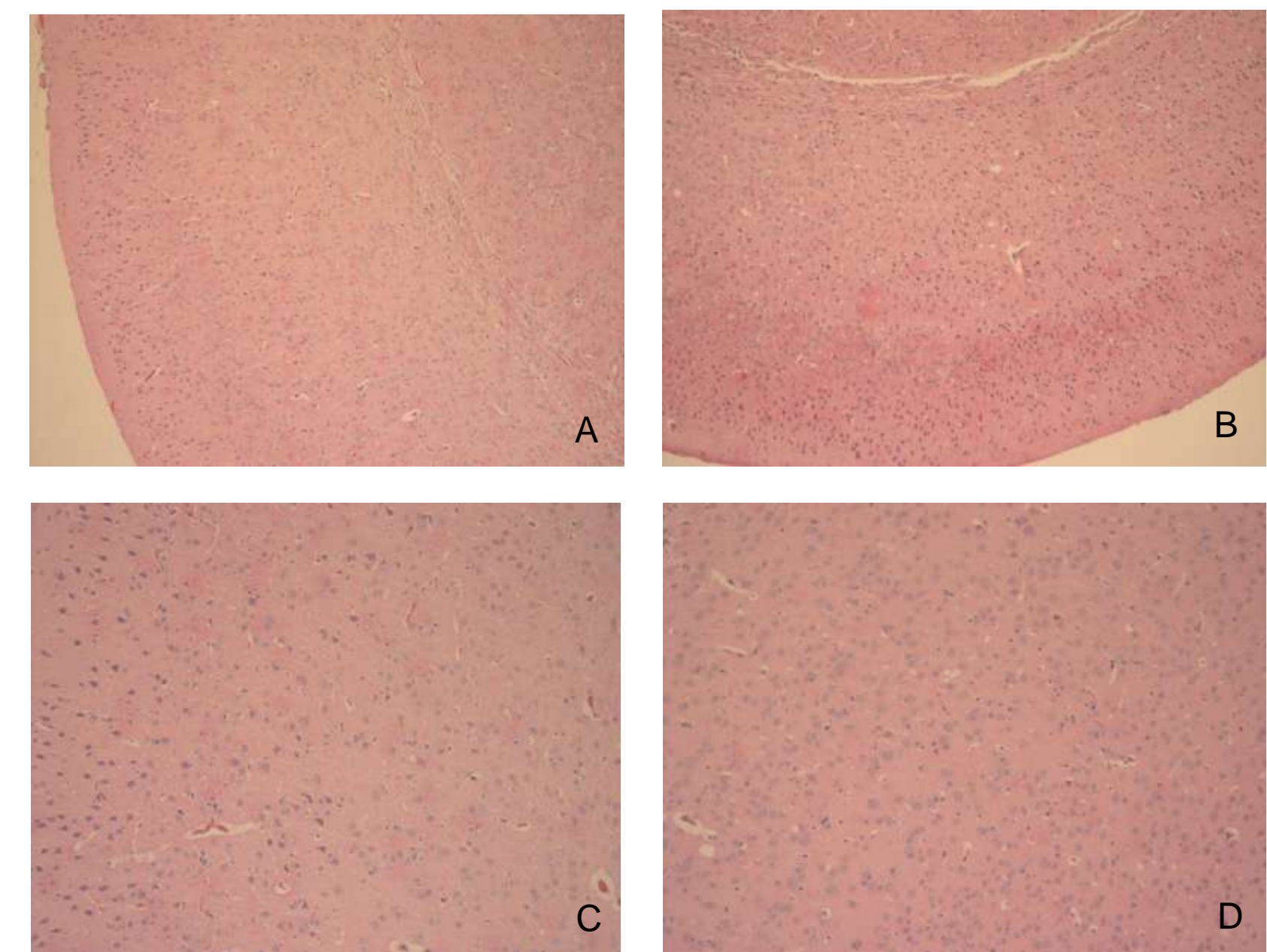


Figura 03. Corte histológico de córtex cerebral de camundongos 30 dias *Gcdh*^{+/+} e *Gcdh*^{-/-} corados com HE. A) *Gcdh*^{+/+} - 10x; B) *Gcdh*^{-/-} - 10x; C) *Gcdh*^{+/+} - 20x; D) *Gcdh*^{-/-} - 20x.

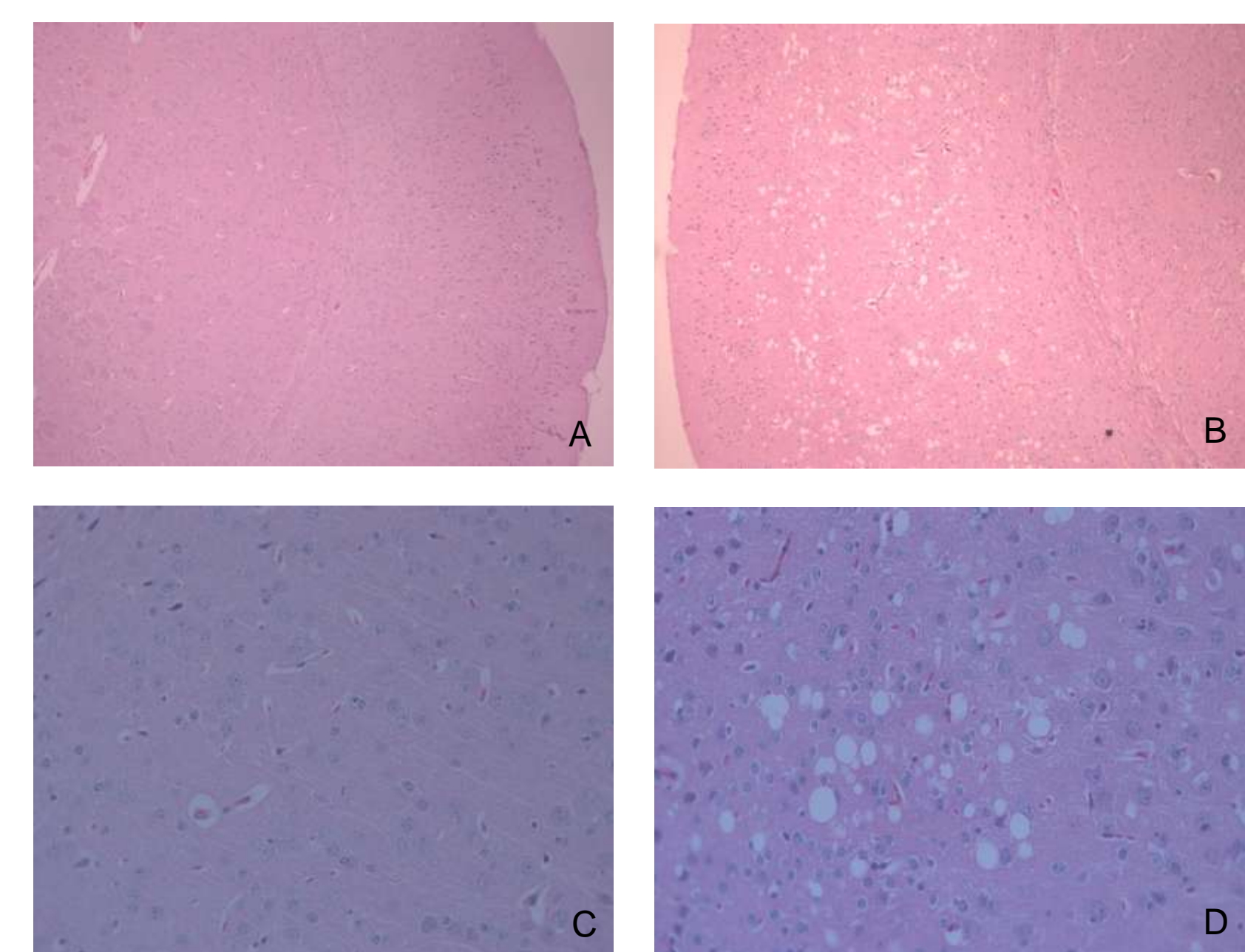


Figura 04. Corte histológico de córtex cerebral de camundongos 60 dias corados com HE. A) *Gcdh*^{+/+} - 10x; B) *Gcdh*^{-/-} - 10x. C) *Gcdh*^{+/+} - 40x D) *Gcdh*^{-/-} - 40x

Conclusões

Os resultados encontrados, como a expressão elevada dos receptores glutamatérgicos - principalmente em animais de 60 dias - somada às alterações estruturais nesse mesmo tempo, sugerem que essas alterações possam estar envolvidas na fisiopatologia da AG-I, explicando, ao menos em parte, a vulnerabilidade dessas estruturas cerebrais ao dano encontrado em pacientes afetados por essa doença.