

Evidência *in vitro* de que os principais ácidos graxos de cadeia média acumulados na deficiência da MCAD prejudicam funções mitocondriais em cérebro e fígado de ratos

Lucas Henrique Rodrigues da Silva¹, Moacir Wajner^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil



INTRODUÇÃO

A deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual predominante dos ácidos octanóico (AO), decanóico (AD) e cis-4-decenóico (ACD), bem como seus derivados de carnitina. Pacientes não-tratados geralmente apresentam crises encefalopáticas, convulsões e coma, além de alterações bioquímicas hepáticas, cuja fisiopatologia é pouco conhecida. No presente estudo, investigamos os efeitos *in vitro* dos AO, AD, ACD, octanoilcarnitina (OC) e decanoilcarnitina (DC), nas concentrações de 0,25 a 2 mM, sobre importantes funções mitocondriais em cérebro e fígado de ratos.

MÉTODOS

Foram utilizadas **preparações mitocondriais**¹ obtidas do cérebro e do fígado de ratos Wistar com 30 dias de vida. Os parâmetros da função mitocondrial investigados foram o estado 3 (estimulado por ADP), o estado 4 (estimulado por oligomicina), o estado desacoplado (estimulado por CCCP) e a razão de controle respiratório (RCR) medidos pelo **consumo de O₂**, o **potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)**^{3,4}, o **conteúdo de NAD(P)H da matriz**⁵ e a **capacidade de retenção de Ca²⁺ mitocondrial**⁶, bem como a **atividade dos complexos II-III**⁷ e **IV**⁸ da cadeia respiratória. Investigamos ainda a **homeostase redox mitocondrial medindo-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)**⁹ e a **produção de H₂O₂ pelas preparações mitocondriais**¹⁰.

RESULTADOS

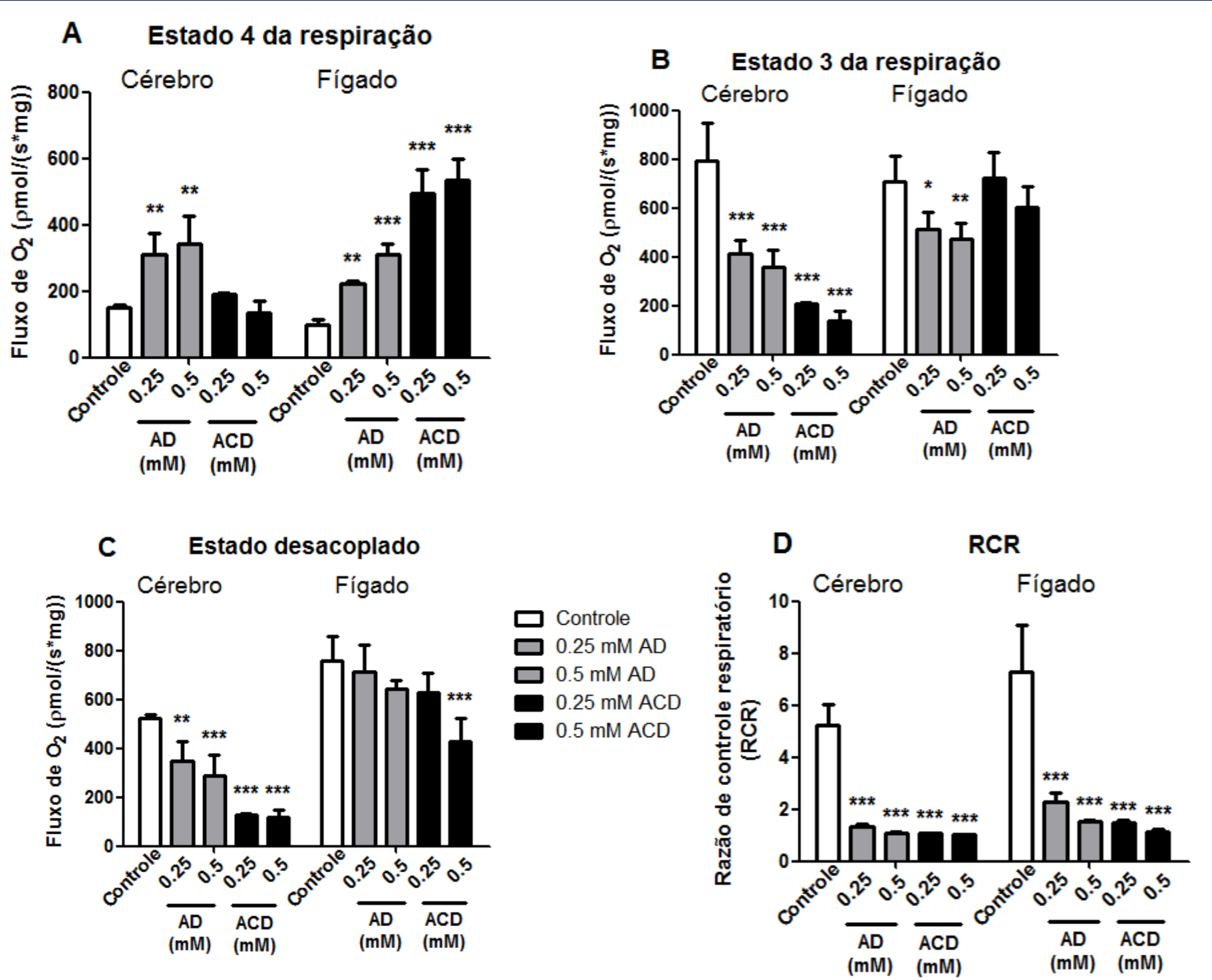


Figura 1. Efeitos dos ácidos decanóico (AD) e cis-4-decenóico (ACD) sobre os parâmetros respiratórios medidos através do consumo de oxigênio em mitocôndrias de cérebro e do fígado. Estimulado por oligomicina (Estado 4) (A), estimulado por ADP (Estado 3) (B), Estimulado por CCCP (estado desacoplado) (C) e razão de controle respiratório (RCR) (D). O glutamato mais malato (2,5 mM cada) foram usados como substratos. As amostras mitocondriais (0,5 mg de proteína·mL⁻¹), o AD e o cDA (0,25–0,5mM) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida. Os controles foram feitos na ausência desses ácidos graxos. Os valores são representados pelas médias \pm desvio padrão, de quatro experimentos independentes e são expressos por pmol O₂·s⁻¹·mg de proteína⁻¹. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, comparado aos controles (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

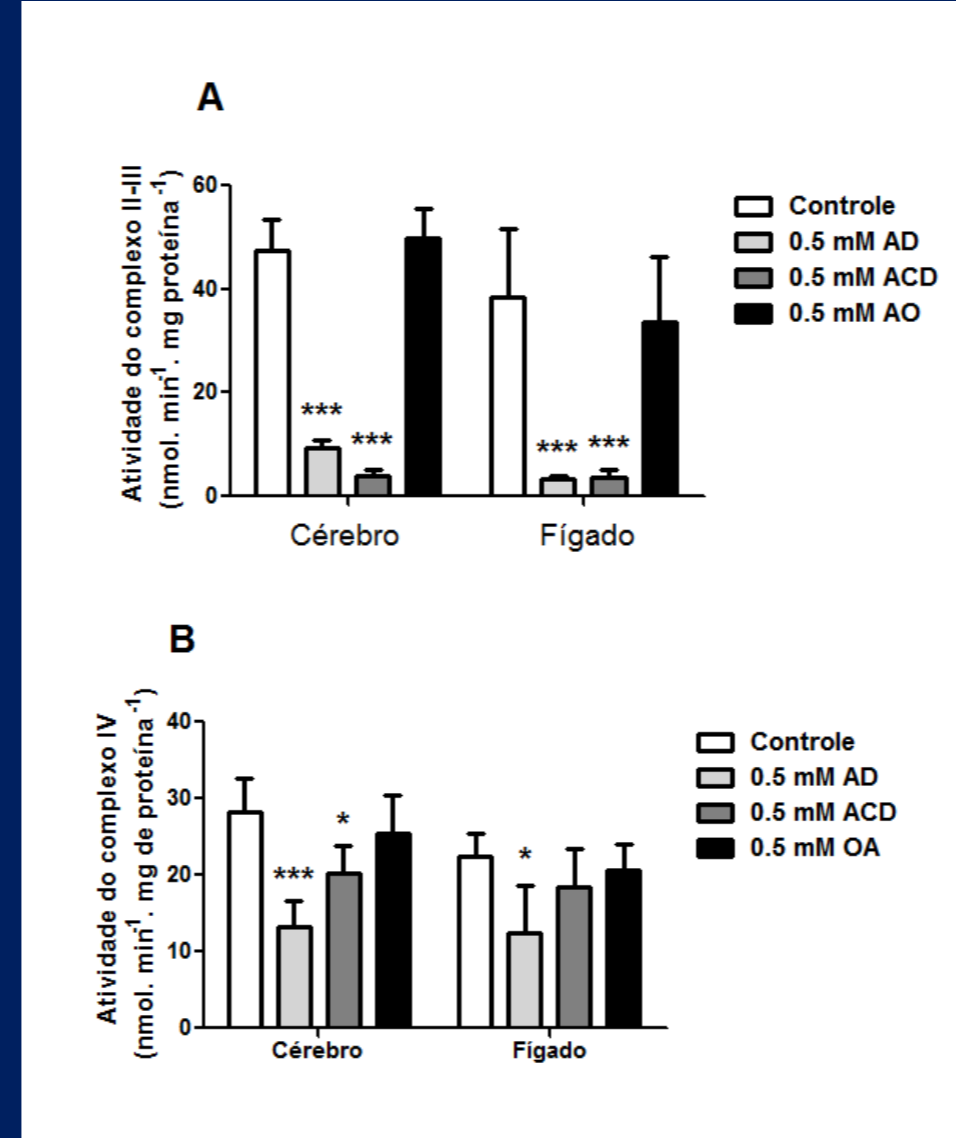


Figura 2. Efeitos dos ácidos decanóico (AD), cis-4-decenóico (ACD) e octanóico (AO) na atividade da cadeia respiratória dos complexos II-III (A) e IV (B) em mitocôndrias de cérebro e fígado. Os valores são médias \pm desvio padrão, de três a cinco experimentos independentes (animais) feitos em triplicata e expressos em nmol de citocromo C oxidado·min⁻¹·mg de proteína⁻¹ (A) e nmol de citocromo C oxidado·min⁻¹·mg de proteína⁻¹ (B). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparado aos controles (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

O AD e particularmente o ACD aumentaram o estado 4 e diminuíram o estado 3 e desacoplado da respiração mitocondrial, bem como o RCR (Fig. 1) e a atividade dos complexos II e II-III da cadeia respiratória em ambos os tecidos (Fig. 2), sugerindo que esses ácidos graxos comprometem a fosforilação oxidativa por se comportarem como desacopladores e inibidores metabólicos. Enfatiza-se que a inibição metabólica foi mais proeminente no cérebro em comparação ao fígado. Além disso, os AD e ACD diminuíram o $\Delta\psi$ (Fig. 3), o conteúdo de NAD(P)H (Fig. 4) e a capacidade de retenção de Ca²⁺ (Fig. 5) em cérebro e fígado, particularmente o ACD. A redução da retenção de Ca²⁺ foi muito mais pronunciada em fígado e totalmente prevenida por ciclosporina A e ADP, bem como pelo vermelho de rutênio, demonstrando o envolvimento do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial e a importância do Ca²⁺. Verificamos ainda que o ACD induziu peroxidação lipídica em cérebro e fígado (Fig. 6) e aumentou a formação de H₂O₂ em cérebro (Fig. 7), sugerindo a participação do dano oxidativo nas alterações provocadas pelo ACD. Por outro lado, os AO, OC e DC não comprometeram os parâmetros avaliados, implicando numa menor toxicidade para esses compostos.

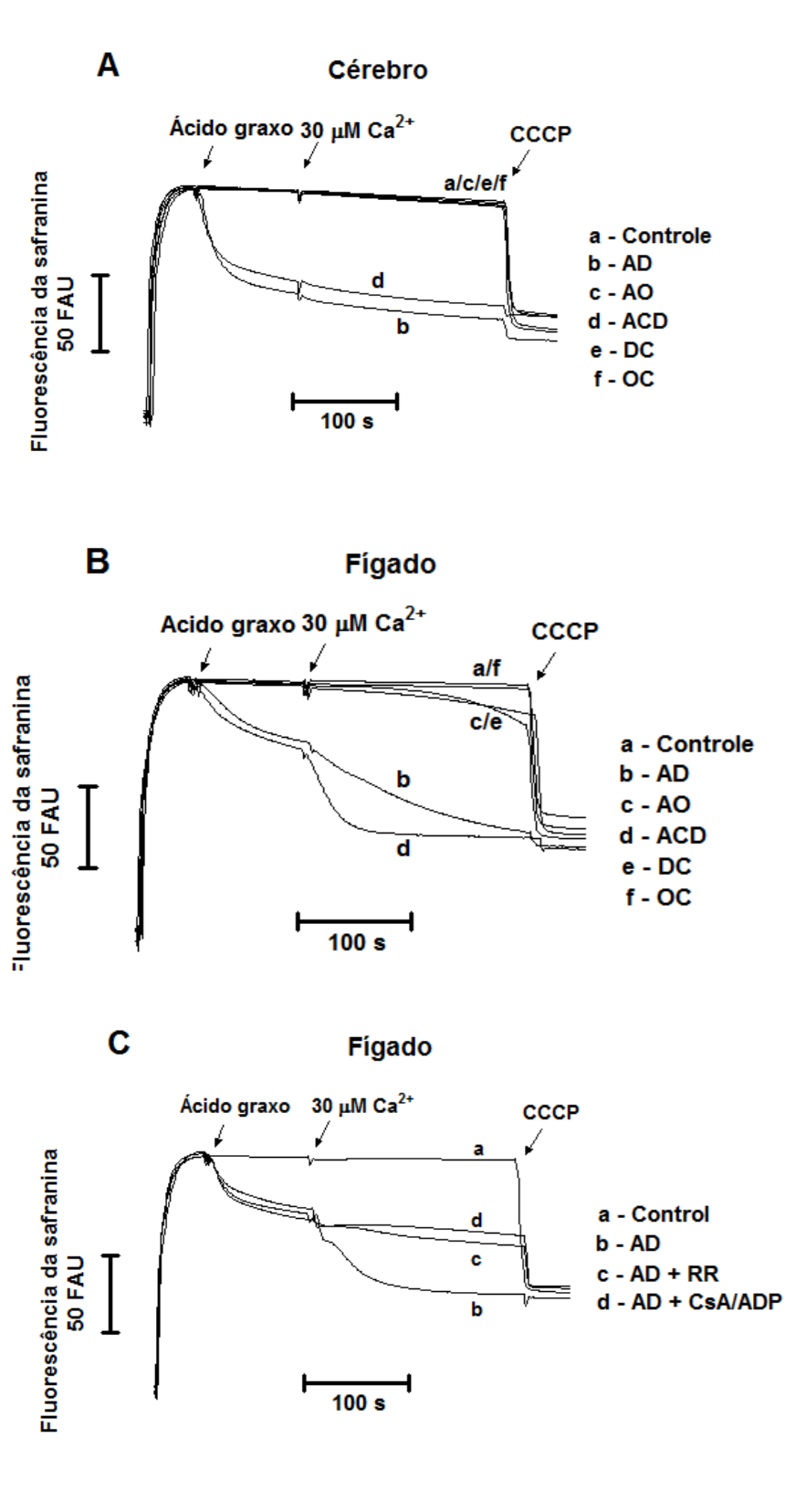


Figura 3. Efeitos dos ácidos decanóico (AD), cis-4-decenóico (ACD) e octanóico (AO), assim como o octanoilcarnitina (OC) e o decanoilcarnitina (DC) no potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias de cérebro (A) e fígado (B-C), suplementadas com Ca²⁺. Todos os experimentos foram feitos em um meio de incubação contendo preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína·mL⁻¹) utilizando-se glutamato e o malato (2,5 mM cada) como substrato. (A-B) AD, AO, ACD, OC e DC (0,5 mM, linhas b-f) foram adicionados 50 s depois do começo da corrida. (C) DA (0,5 mM, linhas b-d). O rutênio vermelho (RR, 1 μ M, linha c) ou a ciclosporina A (CsA, 1 μ M) mais ADP (300 μ M) (linha d) foram adicionados no começo da corrida. Os controles (linha a) foram feitos na ausência de metabólitos. CCCP foi adicionado no final da corrida. Os traços são representações de três experimentos independentes e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (FAU).

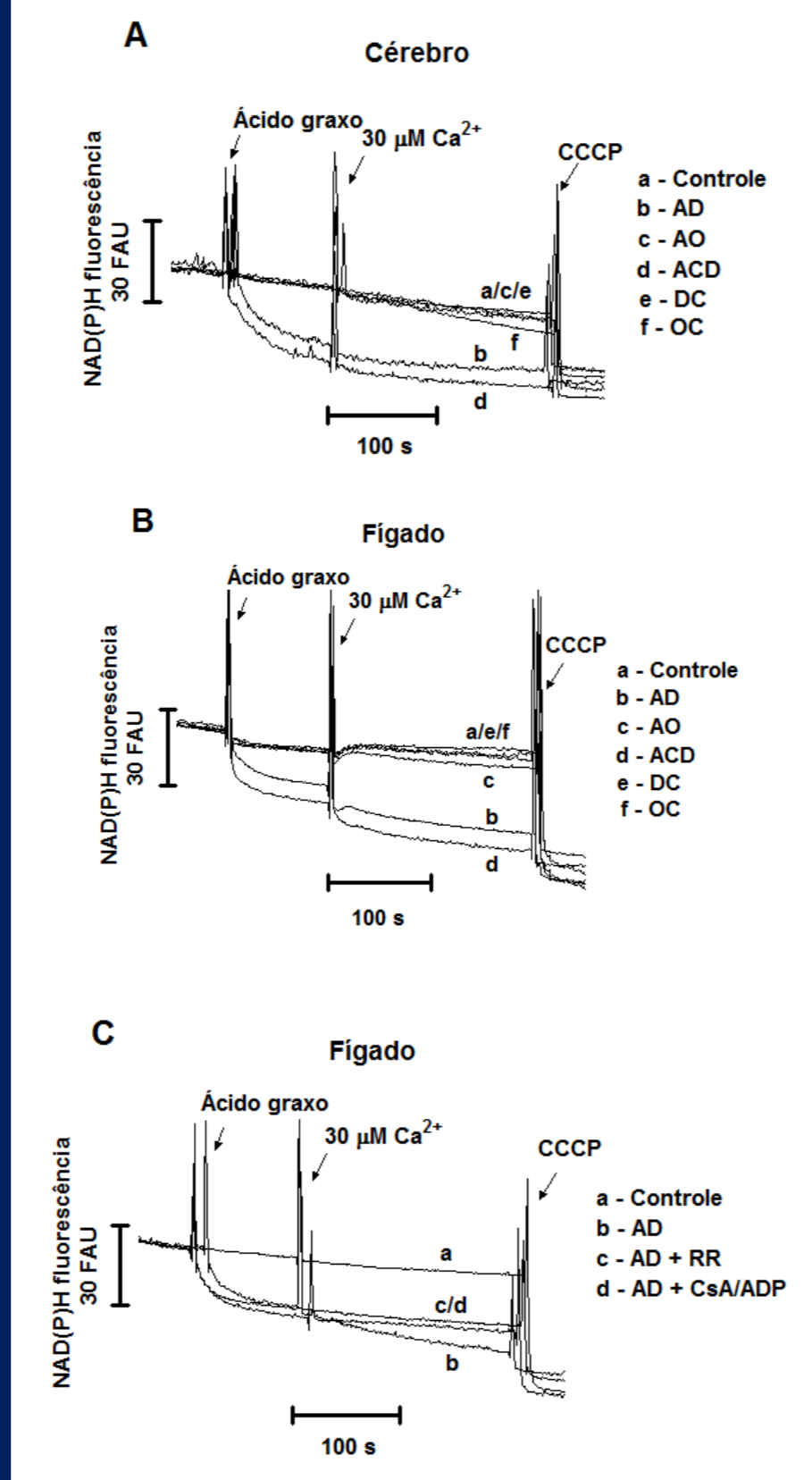


Figura 4. Efeitos dos ácidos decanóico (AD), cis-4-decenóico (ACD) e octanóico (AO), assim como o octanoilcarnitina (OC) e o decanoilcarnitina (DC) no conteúdo mitocondrial de NAD(P)H em mitocôndrias de cérebro (A) e fígado (B-C) Ca²⁺-carregadas. Todos os experimentos foram feitos em um meio contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína·mL⁻¹) utilizando-se glutamato e o malato (2,5 mM cada) como substrato. (A-B) AD, AO, ACD, OC and DC (0,5 mM, linhas b-f) foram adicionados 50 s depois do começo da corrida. (C) DA (0,5 mM, linhas b-d). O rutênio vermelho (RR, 1 μ M, linha c) ou ciclosporina A (CsA, 1 μ M) mais ADP (300 μ M) (linha d) foram adicionados no começo da corrida. Os controles (linhas a) foram feitos na ausência de metabólitos. O CCCP foi adicionado no fim das corridas. Os traços são representações de três experimentos independentes e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (FAU).

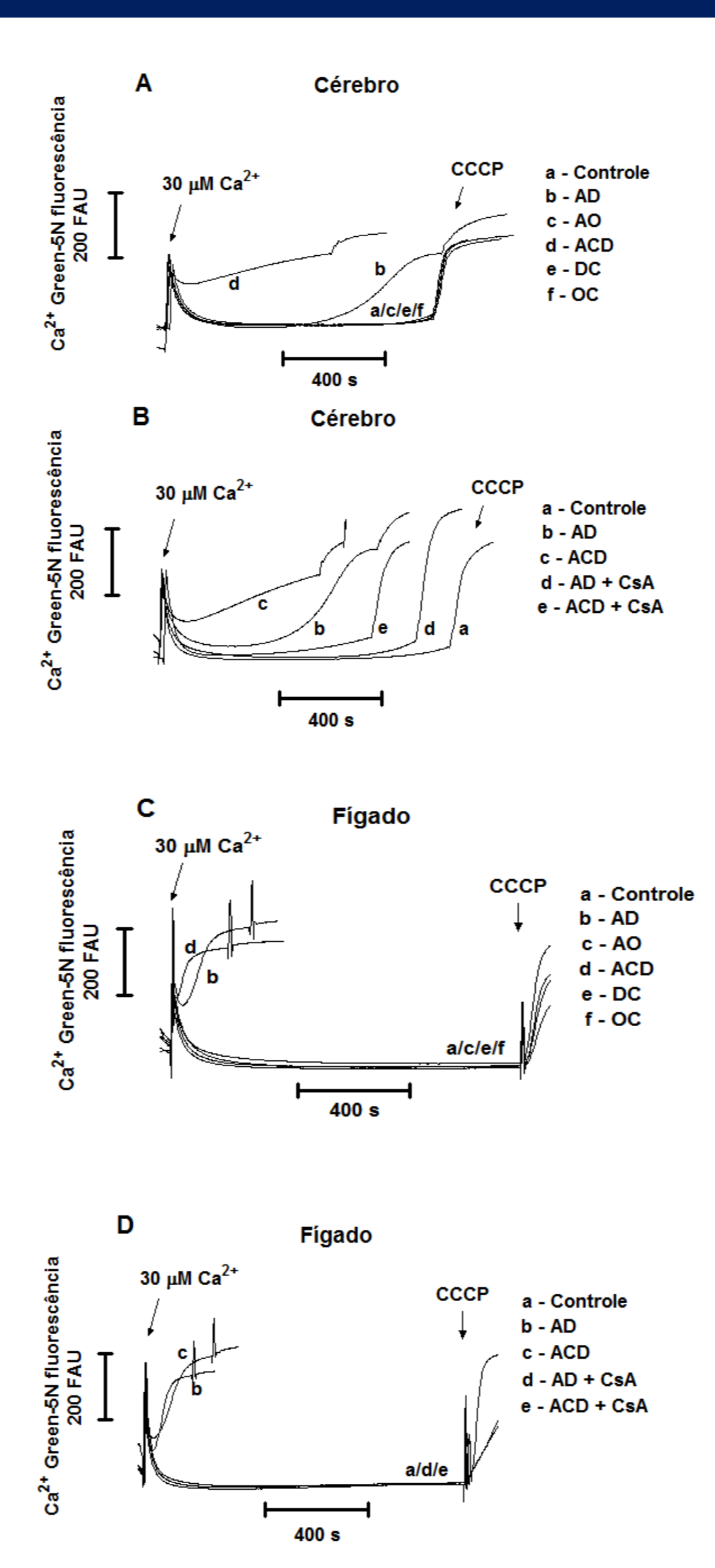


Figura 5. Efeitos dos ácidos decanóico (AD), cis-4-decenóico (ACD) e octanóico (AO), assim como o octanoilcarnitina (OC) e o decanoilcarnitina (DC) na capacidade de retenção mitocondrial de Ca²⁺ em mitocôndrias de cérebro (A-B) e fígado suplementadas com Ca²⁺. Todos os experimentos foram feitos em um meio de incubação contendo preparações mitocondriais (0,5mg de proteína·mL⁻¹) utilizando-se glutamato e malato (2,5 mM cada) como substrato. (A-C) AD, AO, ACD, OC e DC (0,5 mM, linhas b-f) foram adicionados 50 s depois do começo da corrida. (B-D) AD (0,5 mM, linhas b e d), ACD (0,5 mM, linhas c e e) e ciclosporina A (CsA, 1 μ M) (linhas d e e) foram adicionados no começo da corrida. Os controles (linhas a) foram feitos na ausência de metabólitos. O CCCP foi adicionado no final de cada corrida. Os traços são representações de três experimentos independentes e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (FAU).

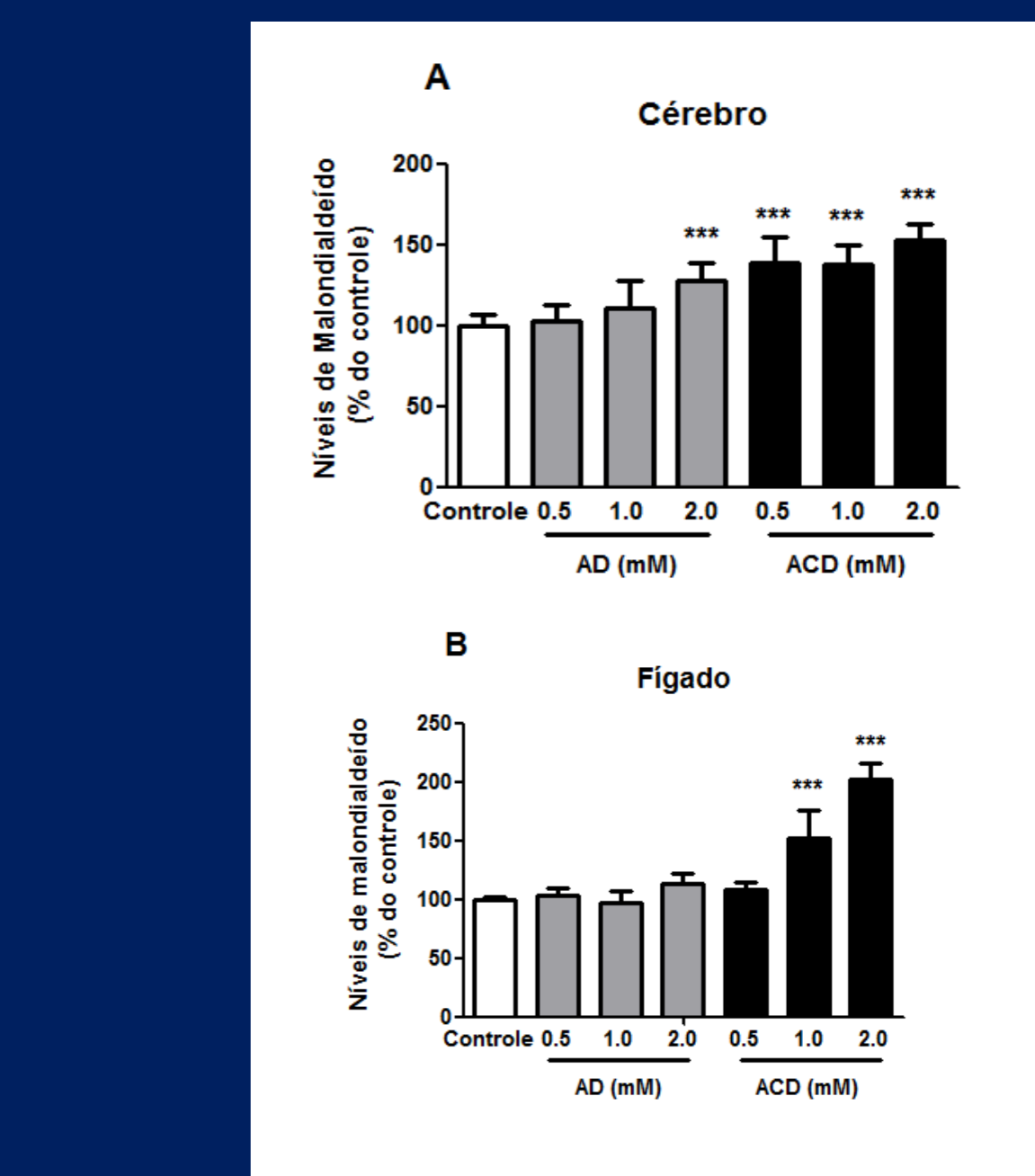


Figura 6. Efeitos do ácido decanóico (AD) e do cis-4-decenóico (ACD) nas concentrações mitocondriais de malondialdeído em mitocôndrias de cérebro (A) e fígado (B). O glutamato e o malato (2,5 mM cada) foram usados como substratos. Preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína·mL⁻¹) e o AD ou o cDA (0,5–2,0 mM) foram adicionados no meio de incubação no começo das corridas, sendo incubados por 30 min a 37 °C. Os controles foram feitos na ausência de metabólitos. Os valores são médias \pm desvio padrão de seis experimentos independentes e são expressos como porcentagens dos controles (controles [nmol MDA·mg de proteína⁻¹]: cérebro: 12,4 \pm 0,79; fígado: 2,27 \pm 0,06). ***P<0,001 (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

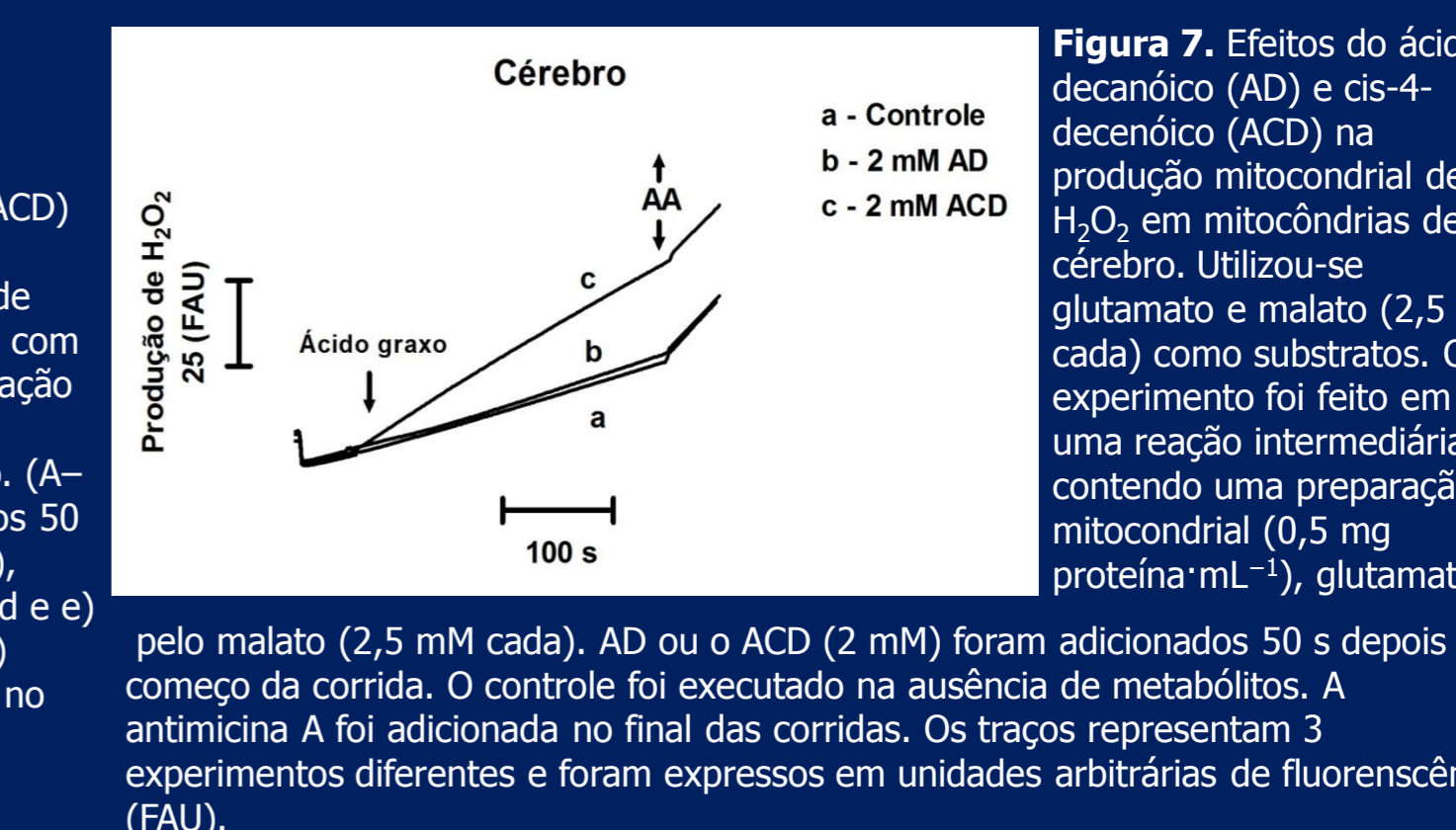


Figura 7. Efeitos do ácido decanóico (AD) e cis-4-decenóico (ACD) na produção mitocondrial de H₂O₂ em mitocôndrias de cérebro. Utilizou-se glutamato e malato (2,5 mM cada) como substratos. O experimento foi feito em uma reação intermediária contendo uma preparação mitocondrial (0,5 mg proteína·mL⁻¹), glutamato e pelo malato (2,5 mM cada). AD ou o ACD (2 mM) foram adicionados 50 s depois do começo da corrida. O controle foi executado na ausência de metabólitos. A antimicina A foi adicionada no final das corridas. Os traços representam 3 experimentos diferentes e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (FAU).

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que os AD e ACD, diferente do AO e das acilcarnitinas de cadeia média, prejudicam importantes funções mitocondriais em cérebro e fígado através de múltiplos mecanismos que estão possivelmente envolvidos na neuropatologia e alterações hepáticas observadas na deficiência da MCAD.

Apoio Financeiro: CNPq, PROPESq/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP IBN-Net and INCT-EN.

REFERÊNCIAS

- [1] Rosenthal et al., 1987. *Flow Metab* 7, 752-8
- [2] Amaral, et al., 2016. *J Neurochem* 137(1); 62-75;
- [3] Akerman and Wikstrom, 1976. *FEBS Lett.* 68:191-197.
- [4] Figueira et al., 2012. *Methods Mol. Biol.* 810: 103-117.
- [5] Schuck et al., 2010. *Life Sci.* 87, 139-46
- [6] Saito and Castilho, 2010. *Neurochem* 35 1667-1674.
- [7] Fischer et al., 1985. *Clin. Chim. Acta* 153: 23-36.
- [8] Rustin et al., 1994. *Clin. Chim. Acta* 228: 35-51.
- [9] Yagi, 1998. *Methods Mol. Biol.* 108: 107-110.
- [10] Mohanty et al., 1997. *J. Immunol. Methods* 202: 133-141.