

EFEITO *IN VITRO* DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS ACUMULADOS NA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO SOBRE PARÂMETROS DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS

Cristiane Cecatto¹, Alexandre Umpierrez Amaral¹, Guilhian Leipnitz¹, Carolina Gonçalves Fernandes¹, Bianca Seminotti¹, Ângela Zanatta¹, Lisiane Aurélio Knebel¹ e Moacir Wajner^{1,2}.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

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

INTRODUÇÃO

A doença do xarope do bordo (DXB) é um distúrbio neurometabólico causado pela deficiência do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos severos, tais como coma e convulsões, bem como edema e atrofia cerebral e acúmulo predominante de leucina (Leu) e dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC) e α -hidroxiisovalérico (HIV) nos tecidos e líquidos biológicos. Embora a DXB seja predominantemente caracterizada por sintomas neurológicos, os mecanismos neurotóxicos do dano cerebral não estão completamente estabelecidos. Portanto, no presente estudo, investigamos o efeito *in vitro* do CIC, HIV e Leu sobre diferentes parâmetros da função mitocondrial em cérebro de ratos jovens.

MÉTODOS

As preparações mitocondriais foram obtidas de ratos Wistar de 30 dias de vida [1]. Os parâmetros mitocondriais determinados foram os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, as razões de controle respiratório (RCR; state 3/state 4) e ADP/O, os níveis de NAD(P)H e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) [2]. Os experimentos foram realizados na presença de 1 e 5 mM de CIC, HIV ou Leu. Glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato foi utilizado como substrato respiratório.

RESULTADOS

A figura 1 mostra que o CIC aumentou o estado 4 e diminuiu o RCR com todos os substratos utilizados. Observamos também que o CIC e a Leu diminuíram o estado 3 quando foi utilizado α -cetogluturato como substrato (Figuras 1 e 2). Além disso, o CIC provocou uma redução na razão ADP/O (Figura 1) e uma diminuição nos níveis de NAD(P)H mitocondrial (Figura 4) utilizando glutamato/malato ou α -cetogluturato como substratos. Finalmente, o CIC e a Leu causaram redução no $\Delta\Psi_m$ quando α -cetogluturato foi o substrato (Figura 3), enquanto o HIV não alterou nenhum parâmetro testado (resultados não mostrados).

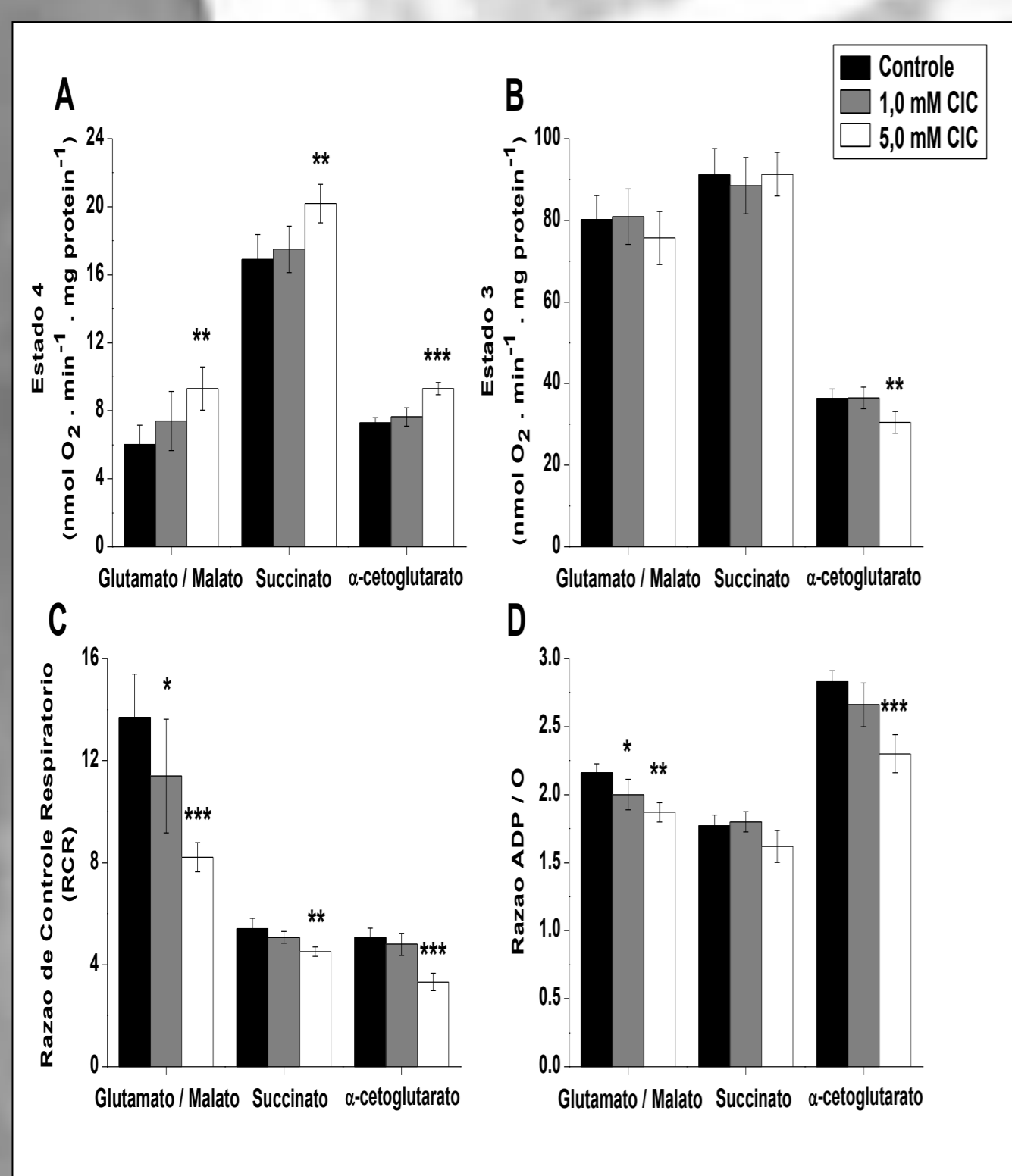


Figura 1. Efeitos *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não-estimuladas por ADP (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B), sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substrato. Após a adição da fração mitocondrial (0,75 mg . mL⁻¹ quando glutamato/malato ou α -cetogluturato foi o substrato e 0,5 mg . mL⁻¹ quando succinato foi o substrato), diferentes concentrações de CIC (1,0 - 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de incubação. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 4 -5) e os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial foram expressos como nmol O₂ . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, comparados ao controle).

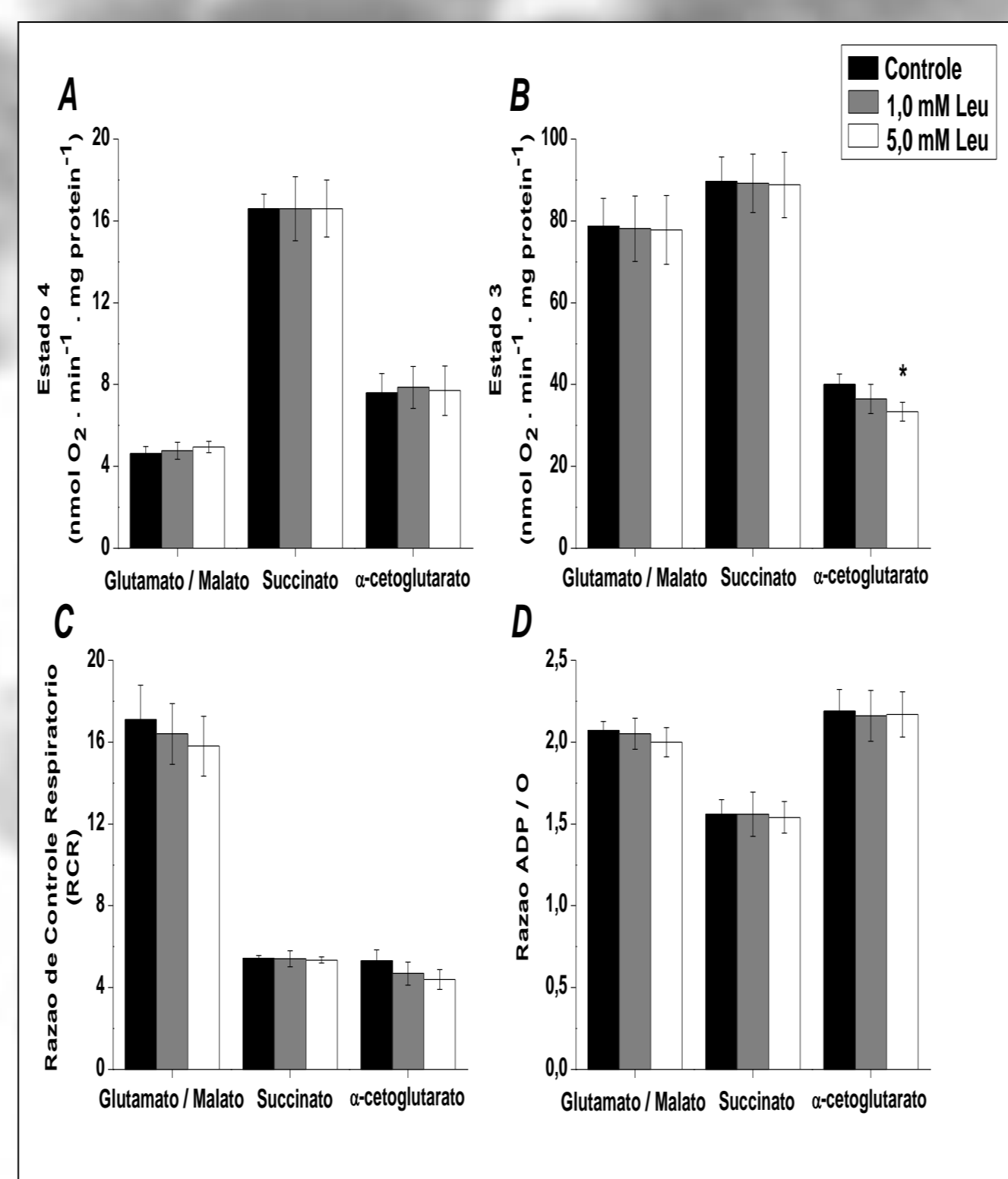


Figura 2. Efeitos *in vitro* da leucina (Leu) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não-estimuladas por ADP (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B), sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substrato. Após a adição da fração mitocondrial (0,75 mg . mL⁻¹ quando glutamato/malato ou α -cetogluturato foi o substrato e 0,5 mg . mL⁻¹ quando succinato foi o substrato), diferentes concentrações de Leu (1,0 - 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de incubação. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 4 -5) e os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial são expressas como nmol O₂ . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (*P<0,05; comparados ao controle).

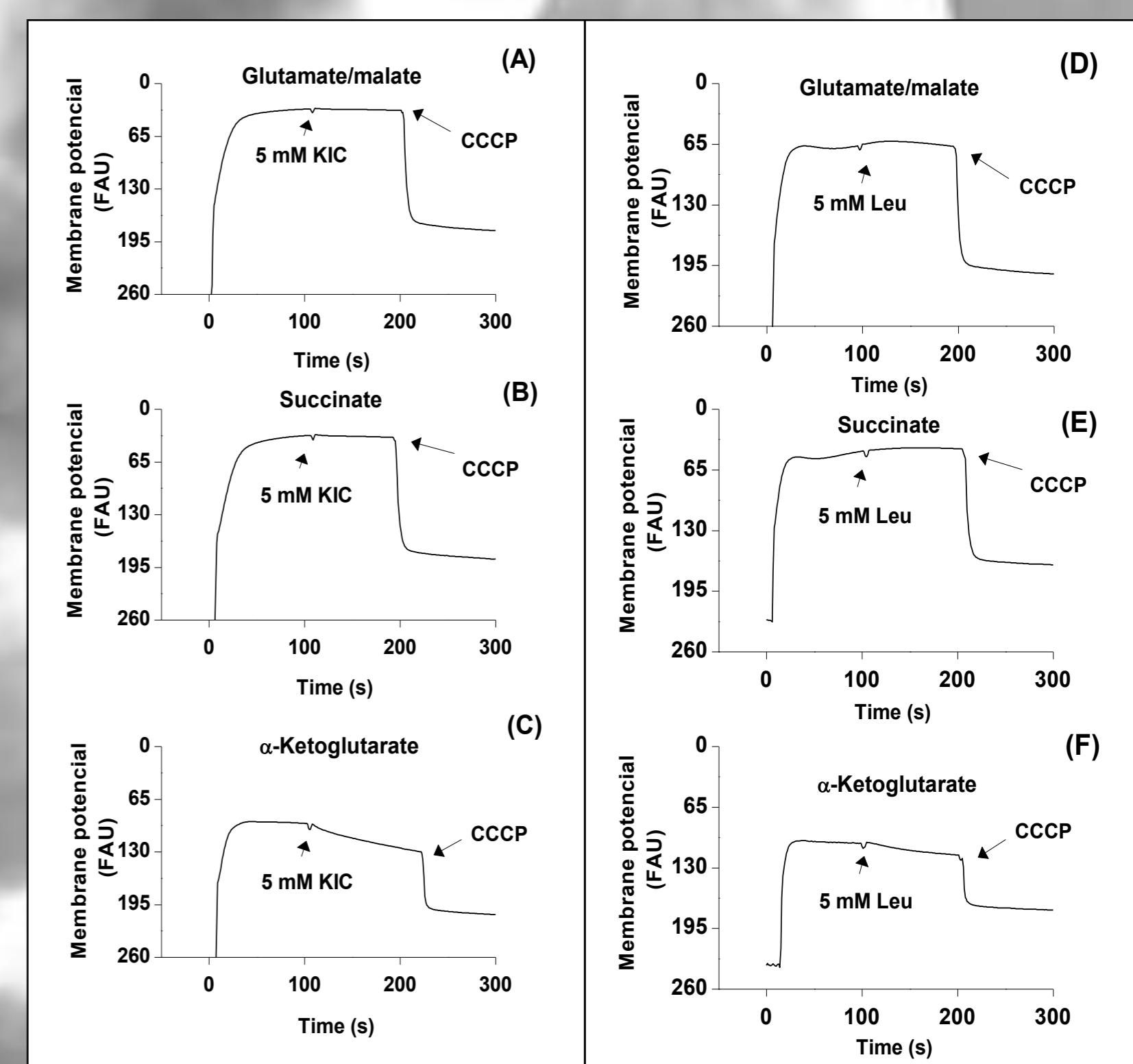


Figure 3. Efeitos *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) e leucina (Leu) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substrato respiratório. Após a adição da fração mitocondrial (0,5 mg . mL⁻¹), o CIC, HIV ou Leu foi adicionado na concentração de 5,0 mM. CCCP (1 μ M) foi adicionado no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

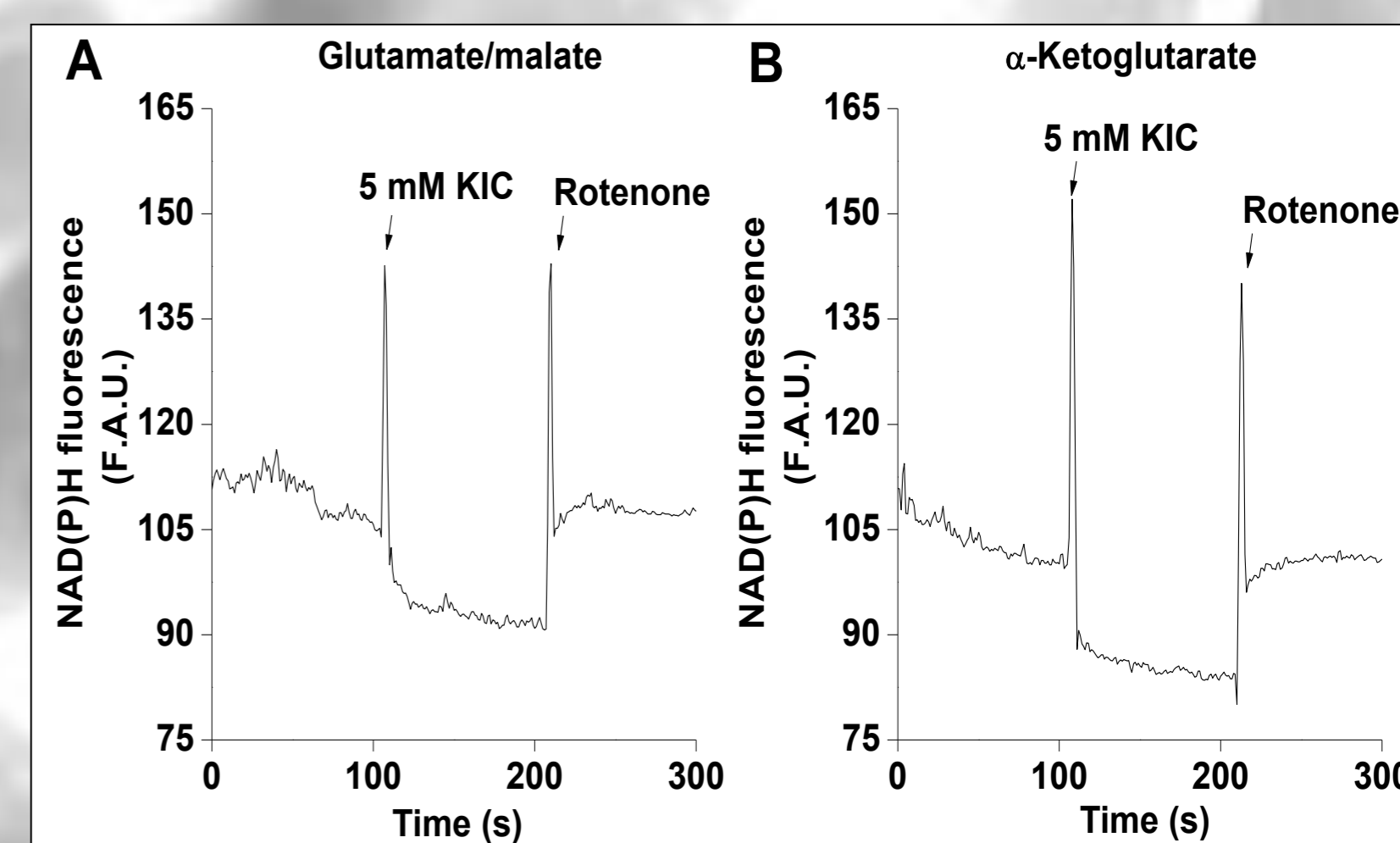


Figura 4. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o conteúdo de NAD(P)H utilizando glutamato/malato (A) ou α -cetogluturato (B) como substrato respiratório. Após a adição da fração mitocondrial (0,5 mg . mL⁻¹), o CIC foi adicionado na concentração de 5,0 mM. Rotenona (ROT, 4 μ M) foi adicionada no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

CONCLUSÕES

O presente estudo indica que o CIC age como um desacoplador da fosforilação oxidativa e como um inibidor metabólico, enquanto que a Leu se comporta como um inibidor metabólico. Portanto, nossos achados sugerem que um comprometimento da homeostase mitocondrial causado pelos principais metabólitos acumulados na DXB pode estar envolvido na neuropatologia dessa doença.

REFERENCES

[1] Rosenthal et al., 1987. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:752-758; [2] Schuck et al., 2009. *Brain*

Res 1296:117-126.

Financial support: Research grants from CNPq, PROPESQ/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) #

01.06.0842-00, INCT-EN.