

# DIMINUIÇÃO DA ATIVIDADE DA ACONITASE E DOS EQUIVALENTES REDUZIDOS DA MATRIZ MITOCONDRIAL PELOS ÁCIDOS ALFA-AMINOADÍPICO E ALFA-CETOADÍPICO QUE SE ACUMULAM NA ACIDÚRIA ALFA-CETOADÍPICA EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS

Bruno Milnitsky 1 ; Moacir Wajner 1,2

1 Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal  
2 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil  
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

## INTRODUÇÃO

A acidúria alfa-cetoaléptica é um erro inato da via de catabolismo de lisina caracterizada pelo aumento das concentrações teciduais dos ácidos alfa-aminoaléptico (AAA) e alfa-cetoaléptico (KAA) devido a uma deficiência na atividade do complexo enzimático alfa-cetoaléptico desidrogenase. Pacientes com esta desordem podem apresentar retardo mental, hipotonia com atraso no desenvolvimento motor, vômitos, tremores e convulsões.

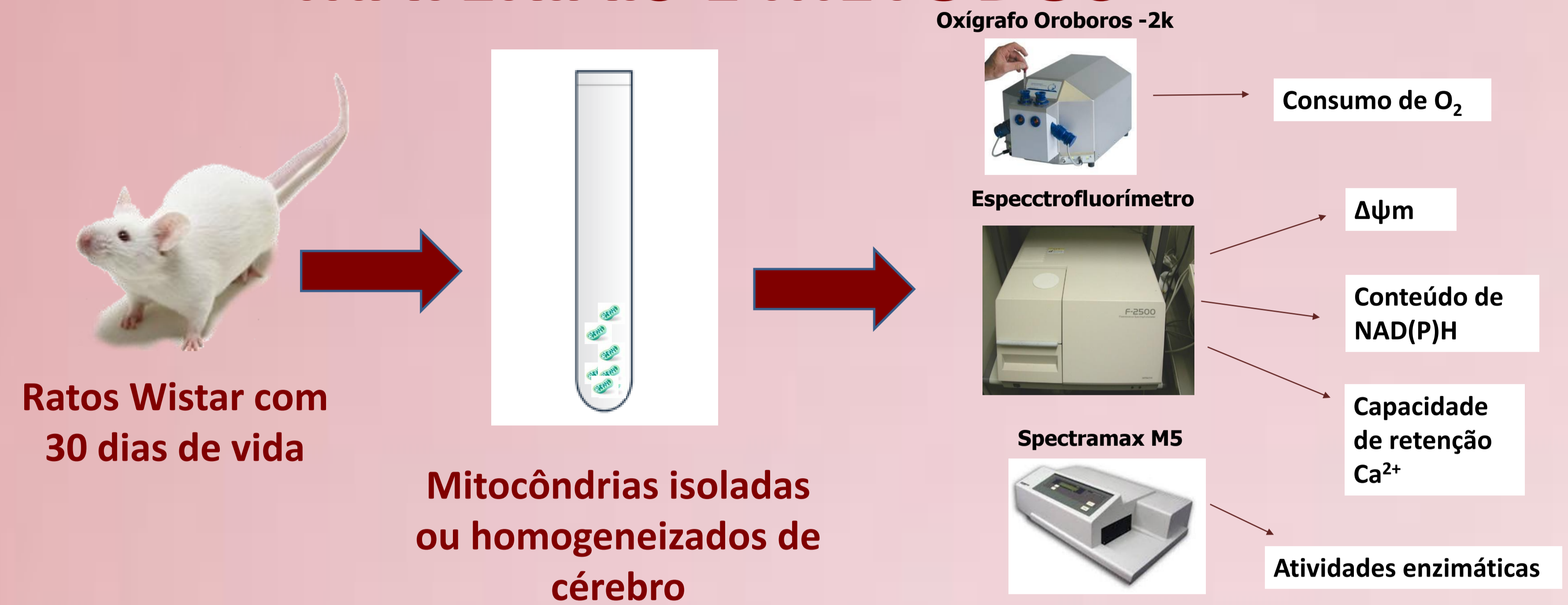
## OBJETIVO

O estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in-vitro* dos AAA e KAA, nas concentrações de 2 e 4 mM sobre importantes funções mitocondriais em preparações mitocondriais purificadas e em homogeneizados de cérebros de ratos.

## RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o AAA e KAA não interferiram nos parâmetros respiratórios (Fig. 1),  $\Delta\psi_m$  (Fig. 2) e capacidade de retenção de cálcio (Fig. 3) em mitocôndrias de cérebro, bem como não alteraram as atividades dos complexos da cadeia respiratória e da CK (Tabela 1) ou da GDH (Fig. 3). No entanto, foi observada uma diminuição significativa na atividade da aconitase (Fig. 4) e no conteúdo de NAD(P)H da matriz mitocondrial (Fig. 5) provocada por esse metabólito, especialmente o KAA. Analisando os resultados em conjunto, podemos concluir que os principais metabólitos acumulados em pacientes com acidúria alfa-cetoaléptica não prejudicam funções importantes da mitocôndria, embora sejam capazes de reduzir a atividade de uma enzima suscetível ao ataque oxidativo e o valor de equivalentes reduzidos, o que indica um prejuízo da homeostase redox mitocondrial.

## MATERIAIS E MÉTODOS



As preparações mitocondriais e homogeneizados [1] foram obtidas de cérebros de ratos Wistar com 30 dias de vida e os parâmetros da função mitocondrial avaliados foram: estado 3, estado 4, estado desacoplado e a razão de controle respiratório medidos pelo consumo de oxigênio [2], o potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) [3], o conteúdo de NAD(P)H da matriz [4] e a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial [5], bem como as atividades dos complexos II [6], II-III [6] e IV [7] da cadeia respiratória, da cretina quinase (CK) [8], glutamato desidrogenase (GDH) [9] e aconitase [10].

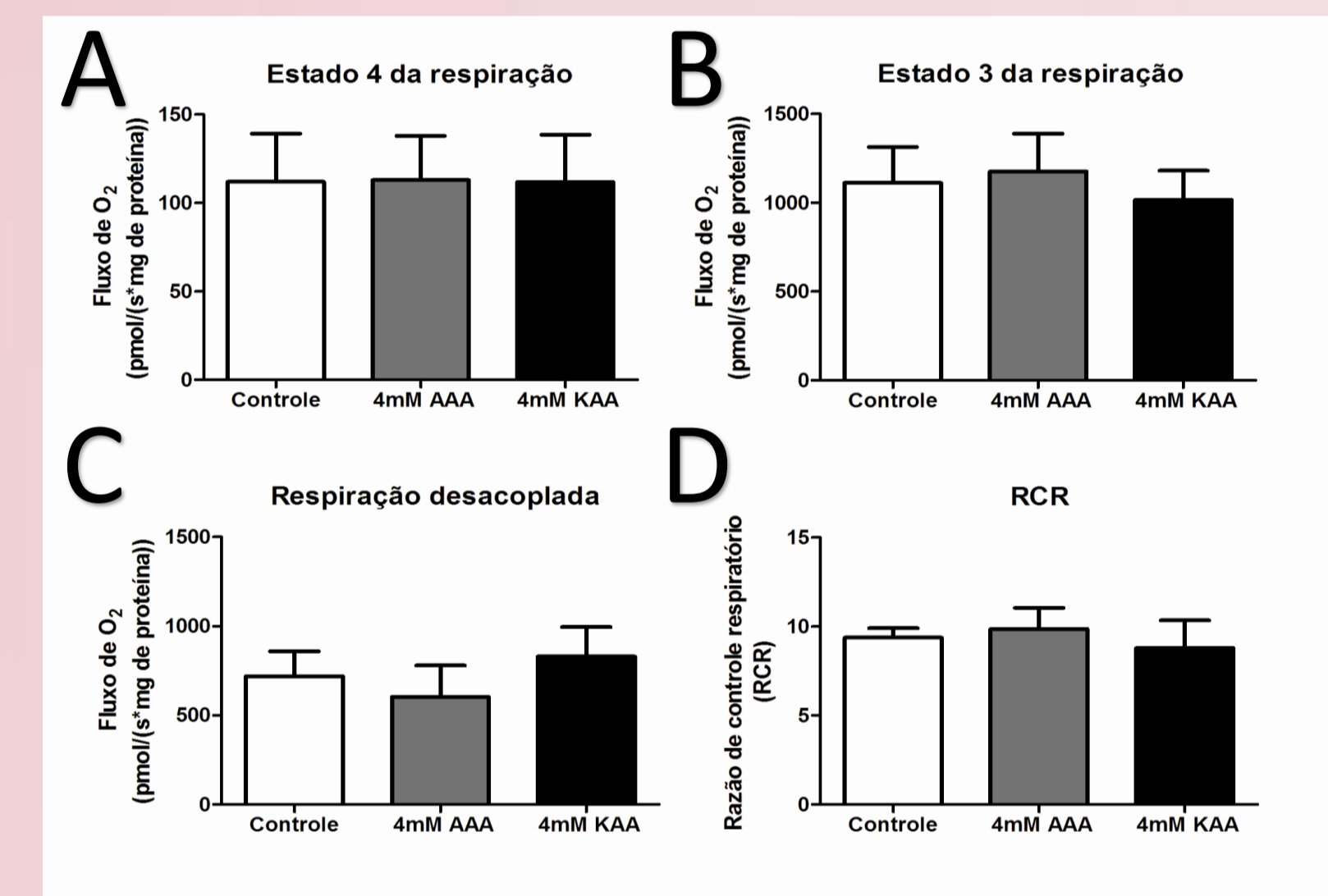


Fig. 1. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre os parâmetros respiratórios medidos pelo consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de cérebro. (A) Estado de repouso (estado 4), (B) estado estimulado por ADP (estado 3), (C) estado estimulado por CCCP (estado desacoplado) e (D) razão de controle respiratório (RCR). Glutamato mais malato (2,5 mM de cada) foram utilizados como substratos. As preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína . mL<sup>-1</sup>), AAA ou KAA (4 mM) foram adicionados ao meio de incubação no início dos experimentos. Os controles foram realizados na ausência dos metabólitos. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão para seis experimentos independentes e estão expressos como pmol O<sub>2</sub> . s<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (Teste de Duncan).

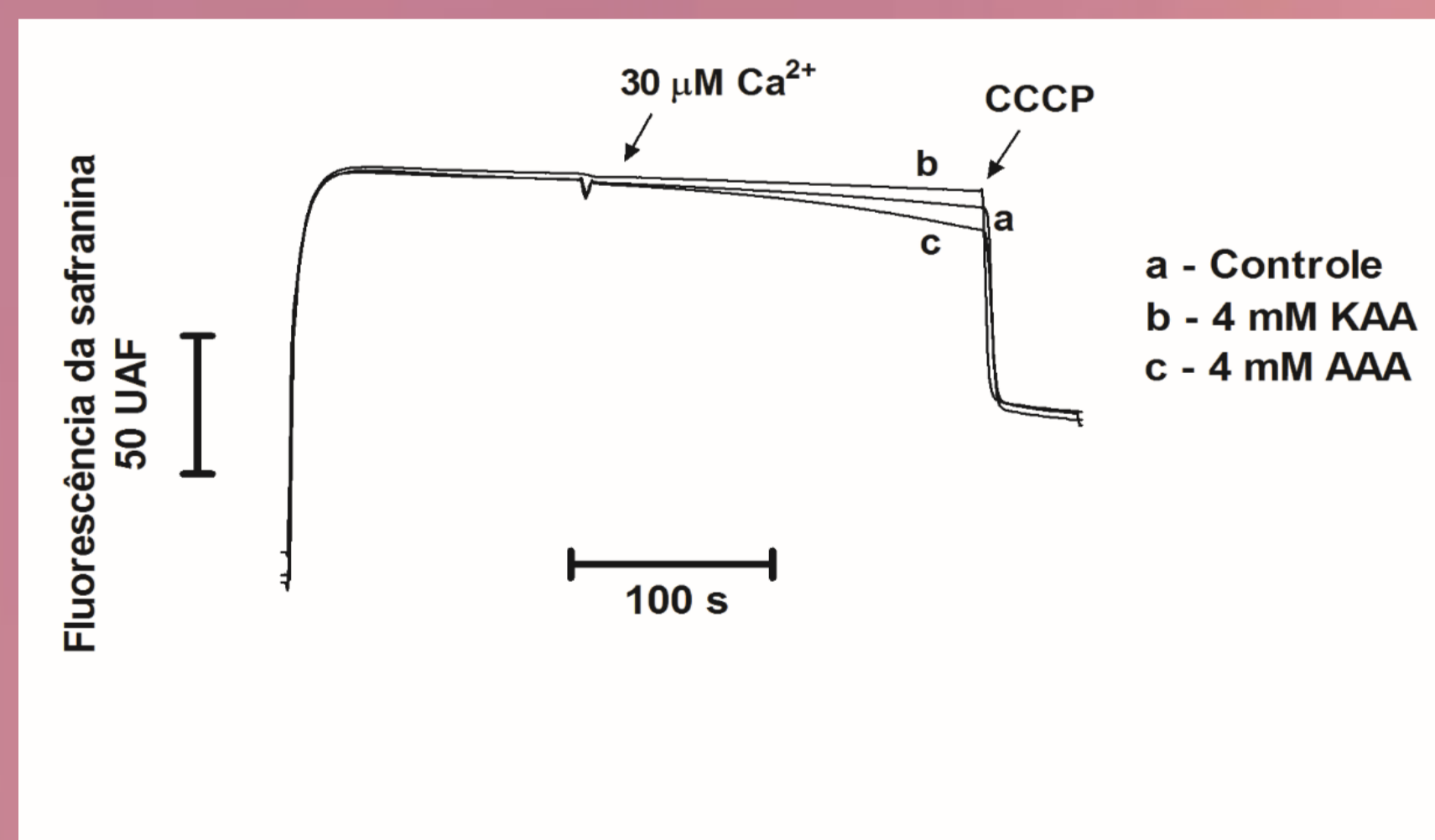


Fig. 2. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em mitocôndrias de cérebro na presença de Ca<sup>2+</sup>. Todos os experimentos foram realizados em um meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína . mL<sup>-1</sup>) utilizando glutamato mais malato como substrato (2,5 mM de cada). AAA (linha b) ou KAA (linha c) (4 mM) foram adicionados no início do ensaio e o Ca<sup>2+</sup> foi adicionado 150 s após o início. Os controles (linhas a) foram realizados na ausência dos metabólitos. CCCP foi adicionado no final dos experimentos. Os traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

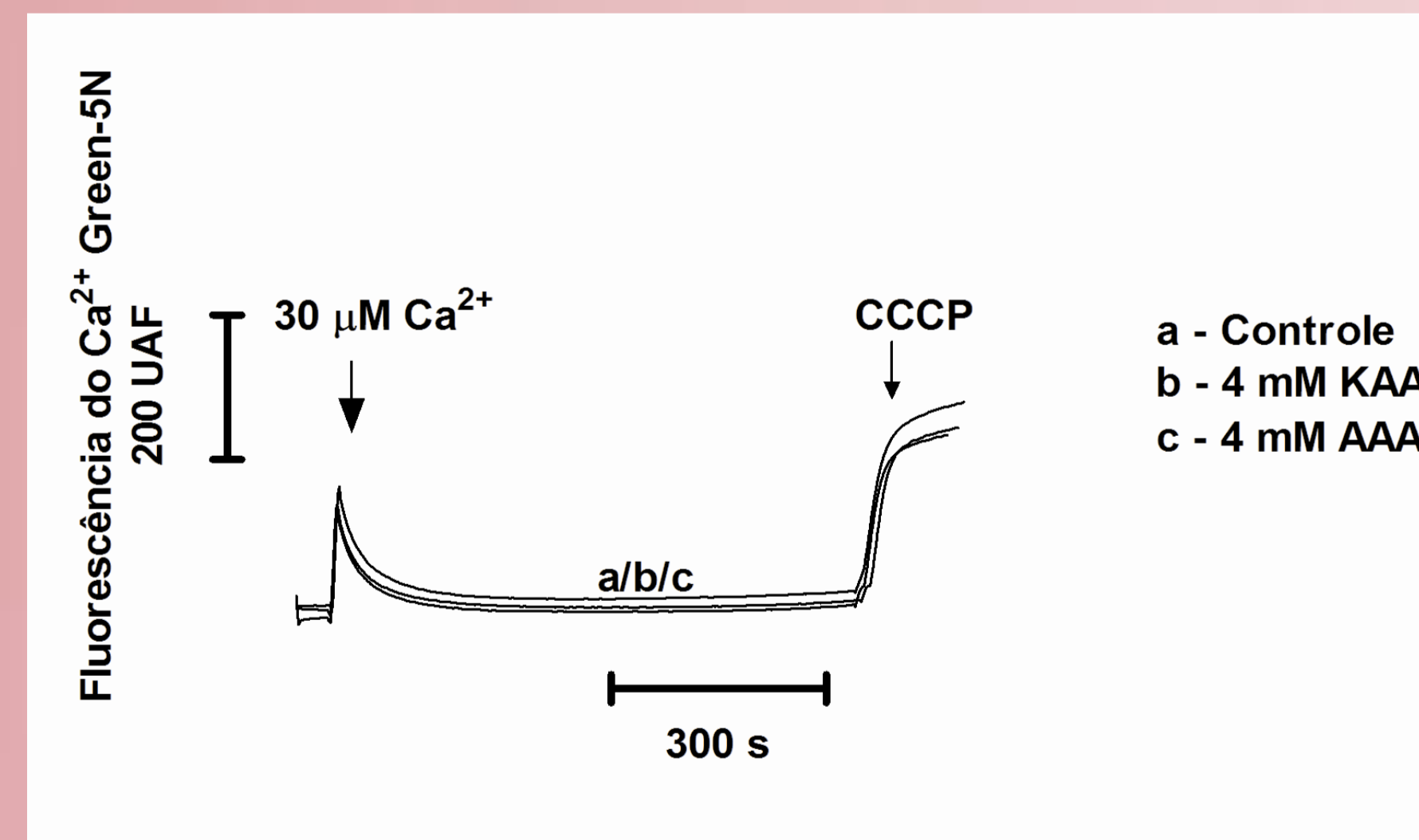


Fig. 3. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre a capacidade de retenção de Ca<sup>2+</sup> em mitocôndrias de cérebro. Todos os experimentos foram realizados em um meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína . mL<sup>-1</sup>) utilizando glutamato mais malato como substrato (2,5 mM de cada). KAA (linha b) ou AAA (linha c) (4 mM) foram adicionados no início do ensaio e o Ca<sup>2+</sup> foi adicionado 2 min após o início. Os controles (linhas a) foram realizados na ausência dos metabólitos. CCCP foi adicionado no final dos experimentos. Os traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

Tabela 1. Atividades dos complexos enzimáticos respiratórios II, II-III e IV e cretina cinase (CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos adolescentes na presença de AAA e KAA.

	Controle	4 mM AAA	4 mM KAA
Complexo II	6,15 $\pm$ 1,56	8,09 $\pm$ 0,58	8,65 $\pm$ 1,91
Complexo II-III	11,10 $\pm$ 1,92	9,91 $\pm$ 1,81	8,79 $\pm$ 1,82
Complexo IV	5,30 $\pm$ 1,29	5,44 $\pm$ 0,88	4,98 $\pm$ 0,86
CK	4,17 $\pm$ 0,66	4,41 $\pm$ 0,71	4,55 $\pm$ 0,59

Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão para quatro a cinco experimentos independentes (animais) realizados em triplicata e estão expressos como nmol . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup> (complexos da cadeia respiratória) e nmol de cretina . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup> (atividade da CK). Não foram identificadas diferenças significativas comparadas ao controle (Teste de Duncan).

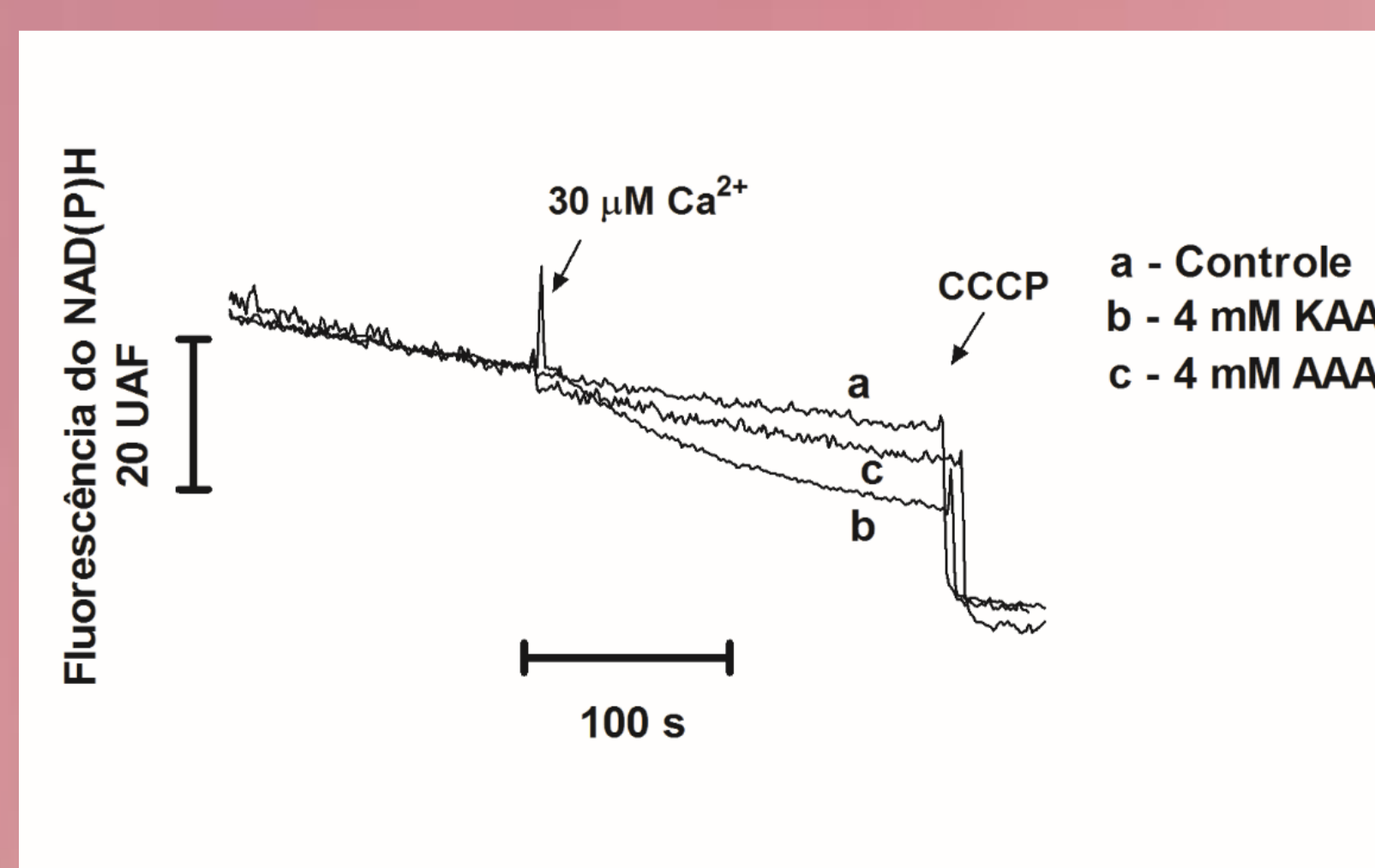


Fig. 4. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre o conteúdo de NAD(P)H da matriz mitocondrial em mitocôndrias de cérebro na presença de Ca<sup>2+</sup>. Todos os experimentos foram realizados em um meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg de proteína . mL<sup>-1</sup>) utilizando glutamato mais malato como substrato (2,5 mM de cada). AAA (linha b) ou KAA (linha c) (4 mM) foram adicionados no início do ensaio e o Ca<sup>2+</sup> foi adicionado 150 s após o início. Os controles (linhas a) foram realizados na ausência dos metabólitos. CCCP foi adicionado no final dos experimentos. Os traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

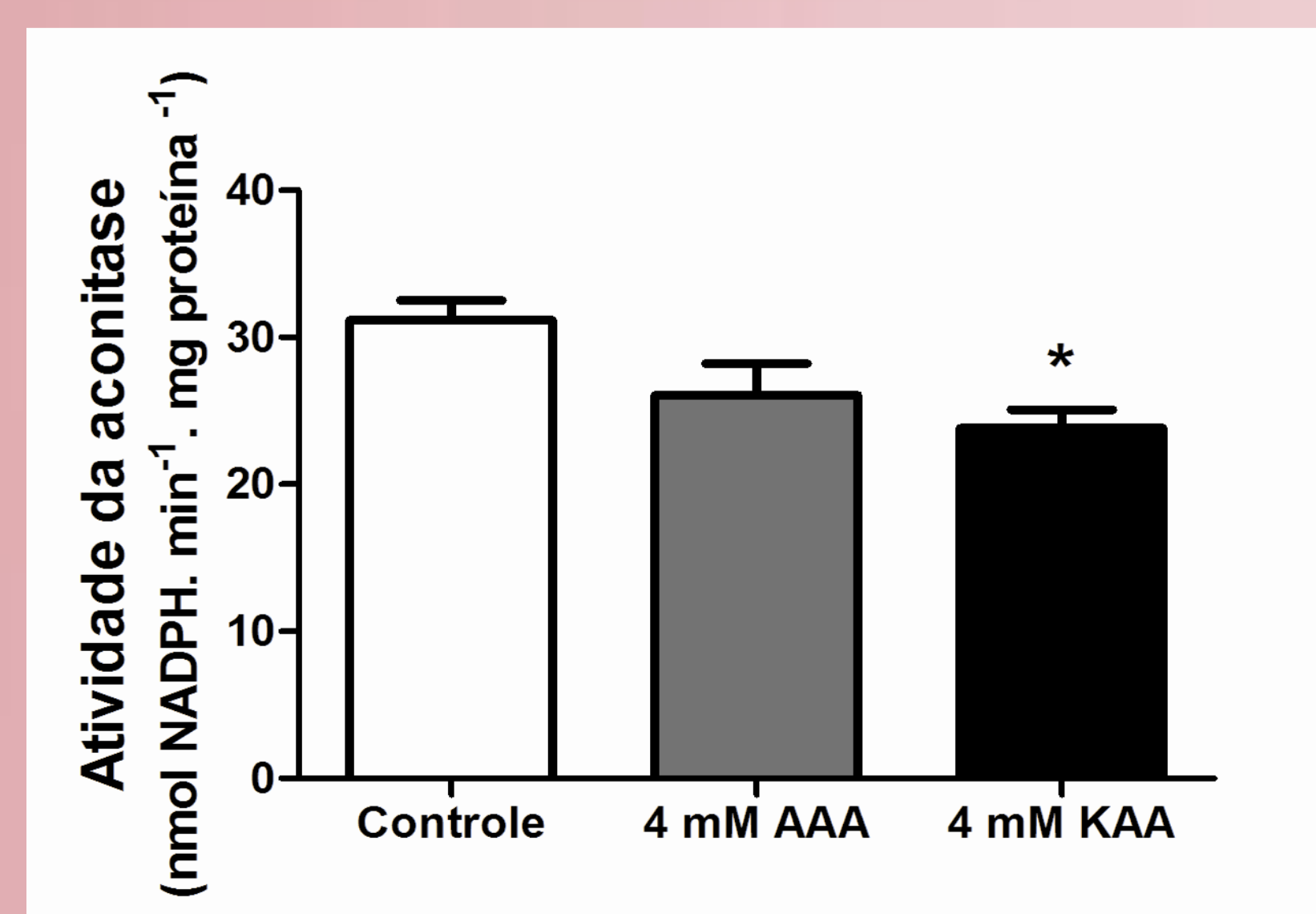


Fig. 5. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre a atividade da aconitase em preparações mitocondriais de cérebro. As frações mitocondriais foram incubadas por 30 min a 37°C com AAA ou KAA (4 mM). Os controles foram realizados na ausência dos metabólitos. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão para quatro a seis experimentos independentes e estão expressos como nmol NADPH . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>. \*P < 0,05 comparados ao controle (Teste de Duncan).

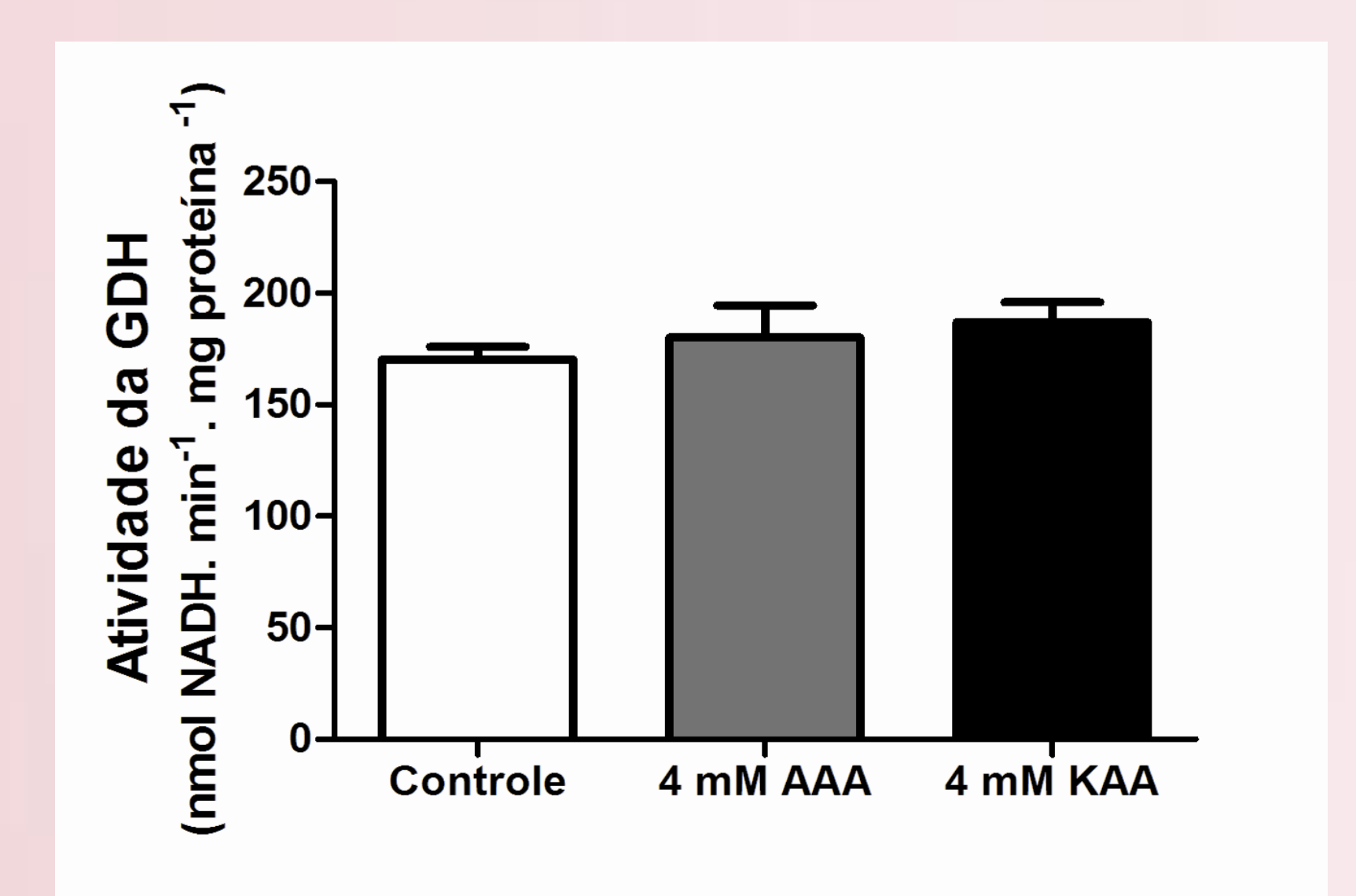


Fig. 6. Efeitos dos ácidos aminoaléptico (AAA) e cetoaléptico (KAA) sobre a atividade da glutamato desidrogenase (GDH) em preparações mitocondriais de cérebro. As frações mitocondriais foram incubadas por 30 min a 37°C com AAA ou KAA (4 mM). Os controles foram realizados na ausência dos metabólitos. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão para quatro a seis experimentos independentes e estão expressos como nmol NADH . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (Teste de Duncan).

**REFERÊNCIAS:** [1] Mirandola, et al. (2008). J Inherit Metab Dis 31: 44-54; [2] Amaral, et al. (2016). J Neurochem 137(1):62-75; [3] Akerman e Wikstrom (1976). FEBS Lett 68(2): 191-197; [4] Schuck et al. (2010). Life Sci 87(5-6): 139-146; [5] Saito e Castilho (2010). Neurochem Res 35(11): 1667-1674; [6] Fischer et al. (1985) Clin Chim Acta. 153:23-36; [7] Rustin et al. (1994). Clin Chim Acta. 228:35-51; [8] Hughes (1962). Clin Chim Acta. 7:597-603, 1962; [9] Skytt et al. (2012). Neurochem int., 61, 490-497; [10] Morrison (1954). Biochem J. 56:xxxvi.

Apoio financeiro: CNPq, PROPESq/UFRGS, FAPERGS, FINEP IBN-Net e INCT-EN.