

Evidência experimental que os ácidos graxos acumulados na deficiência da VLCAD causam disfunção mitocondrial em músculo esquelético 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 desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD) é a doença mais freqüente da β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa com uma incidência de 1:50.000-1:100.000 nascidos vivos. É bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa, especialmente os ácidos cis-5-tetradecenoico (Cis-5) e mirístico (Myr), e seus derivados de carnitina. A doença é clinicamente heterogênea, entretanto os pacientes geralmente apresentam cardiomiopatia, hepatopatia com hipoglicemia hipocetótica recorrente, bem como fraqueza muscular, mialgia, episódios de mioglobinúria e rabdomiólise. As manifestações são principalmente induzidas por situações catabólicas como jejum, exercício, infecções e hipertermia que também estão associadas com um aumento significativo das concentrações dos metabólitos acumulados.

MÉTODOS

Investigamos os efeitos *in vitro* do Cis-5 e do Myr sobre importantes parâmetros de bioenergética, medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de músculo esquelético, utilizando um aparelho OROBOROS que contém eletrodos de oxigênio. Também foram determinadas a produção de ATP através da luminescência da luciferina e anisotropia que reflete a fluidez de membrana mitocondrial. Os parâmetros respiratórios medidos são estimulados pela adição de substratos. A adição de ADP determina o estado 3 (respiração fosforilante e rápida), oligomicina o estado 4 (respiração de repouso e não fosforilante) e o CCCP o estado desacoplado (respiração rápida não fosforilante).

RESULTADOS

Myr e Cis-5 aumentaram significativamente o estado 4 da respiração mitocondrial utilizando glutamato mais malato (GM) ou succinato como substratos, indicando um comportamento desacoplador (Fig 1 e 2). Além disso, estes ácidos graxos diminuíram significativamente o estado 3 e a respiração desacoplada, sugerindo inibição metabólica. Neste particular, observamos que esses efeitos inibitórios foram mais pronunciados utilizando GM e Myr quando comparados ao uso do succinato e com o Cis-5. Também observamos que Myr e Cis-5 diminuíram a produção de ATP (Fig 23), sem alterar a fluidez da membrana mitocondrial (não mostrados), tornando improvável a desestabilização da membrana mitocondrial pela interação desses ácidos graxos com os fosfolípidos de membrana.

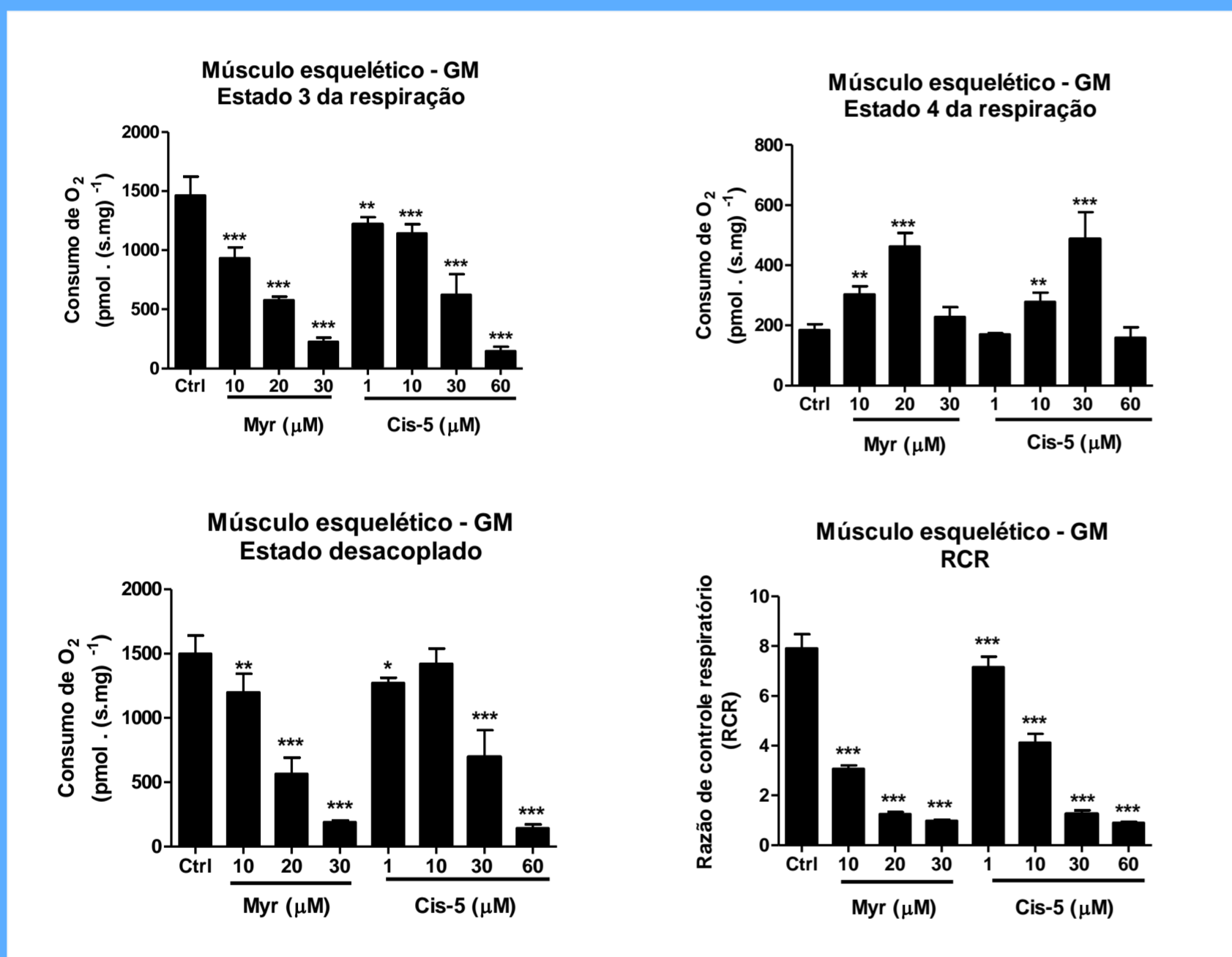


Fig 1. Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecenoico (Cis-5) no estado 3 (estimulado por ADP), estado 4 (estimulado por oligomicina), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) em mitocôndrias de músculo esquelético, tendo como substratos glutamato e malato (2,5 mM cada). Myr e Cis-5 (10-30 μM) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL⁻¹). Os valores são médias ± desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O₂ . (s.mg de proteína)⁻¹. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparado aos controles.

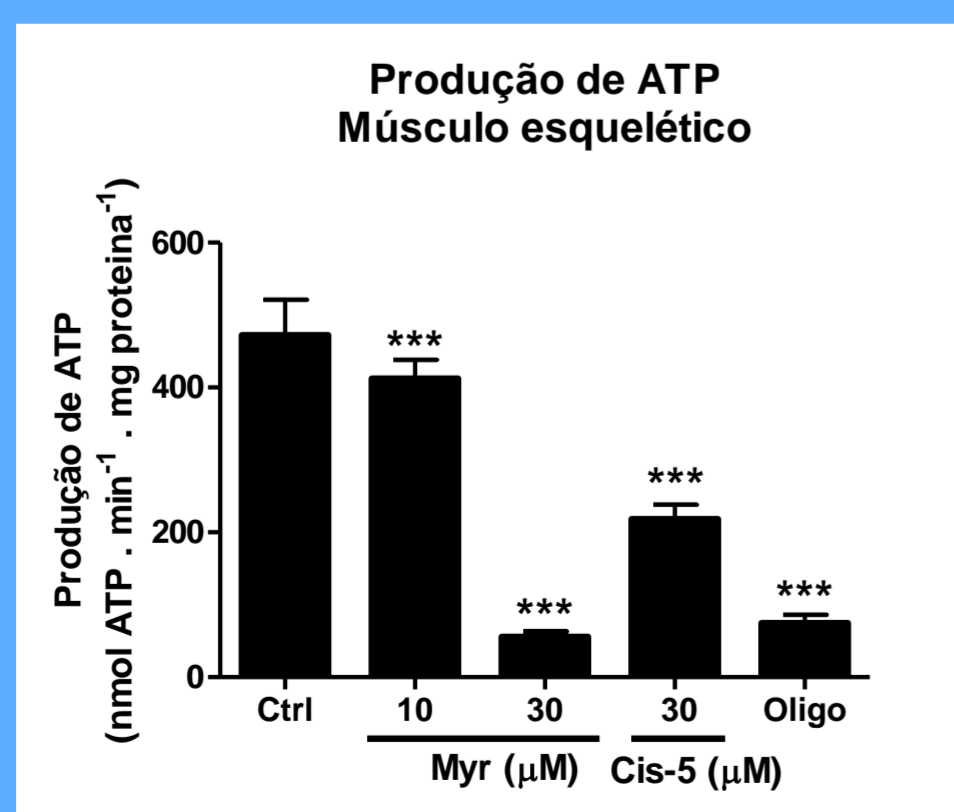


Fig 3. Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecenoico (Cis-5) na produção de ATP em mitocôndrias de músculo esquelético. Myr e Cis-5 (10-30 μM) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL⁻¹ de proteína). Os valores são médias ± desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O₂ . (s.mg de proteína)⁻¹. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparado aos controles.

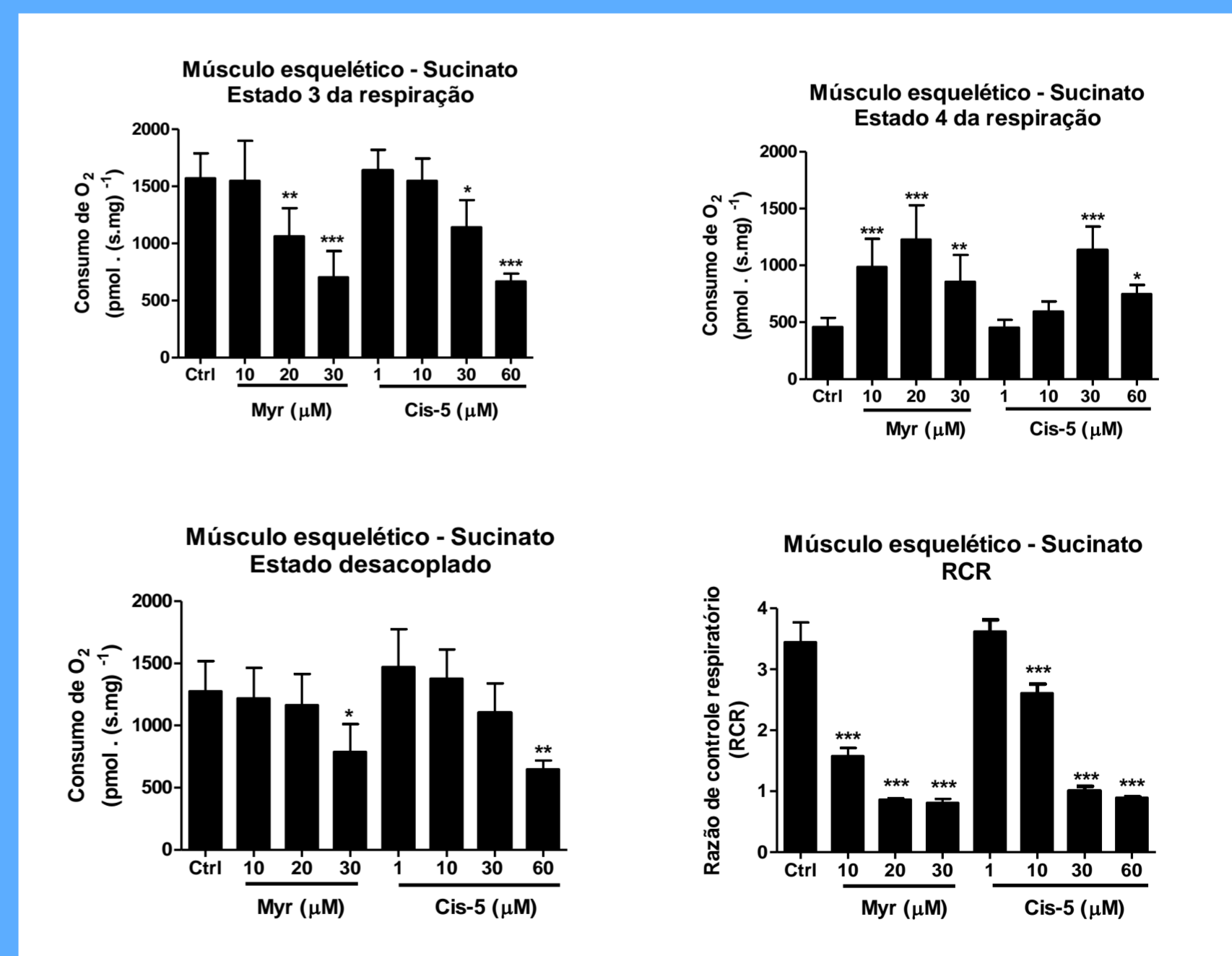


Fig 2. Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecenoico (Cis-5) no estado 3 (estimulado por ADP), estado 4 (estimulado por oligomicina), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) em mitocôndrias de músculo esquelético, tendo como substrato succinato. Myr e Cis-5 (10-30 μM) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL⁻¹). Os valores são médias ± desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O₂ . (s.mg de proteína)⁻¹. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparado aos controles.

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam mitotoxicidade comprometendo a respiração mitocondrial pelos ácidos graxos que mais se acumulam na deficiência da VLCAD, que possivelmente possa estar associada aos sintomas musculares e às anormalidades esqueléticas que são frequentemente observadas nos pacientes acometidos por essa doença.

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.