

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A proteína trifuncional mitocondrial (MTP) é um complexo multienzimático associado à membrana mitocondrial interna que participa da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. A MTP possui as atividades catalíticas de 2-enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (LCHAD) e 3-cetoacil-CoA tiosulfolase. Mutações nos genes que codificam o complexo da MTP podem levar à deficiência nas três atividades catalíticas caracterizando a deficiência da MTP ou, mais comumente, uma deficiência isolada de uma unidade catalítica, como a deficiência da LCHAD. Distúrbios cardíacos são os achados clínicos mais proeminentes nessas deficiências e incluem cardiomiopatia, arritmias, síndrome Reye-like, acidemia láctica e morte neonatal. Considerando que os pacientes afetados apresentam acúmulo de 3-hidroxiácidos de cadeia longa nos tecidos e líquidos corporais, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA), acumulado nessas deficiências, sobre homeostase mitocondrial em coração de ratos jovens.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos Wistar de 30 dias. Os parâmetros avaliados foram os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, a razão de controle respiratório (RCR), o potencial de membrana ($\Delta\psi$) (Akerman and Wikstrom, FEBS Lett., 1976, 68(2):191-197) e o conteúdo de NAD(P)H (Maciel et al., J. Neurochem, 2004, 90:1025–1035).

RESULTADOS

Observamos que o 3HTA aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu a razão de controle respiratório tanto utilizando glutamato/malato quanto succinato como substratos, sugerindo um efeito desacoplador. O 3HTA também diminuiu o $\Delta\psi$ e o conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial, além de diminuir a produção de peróxido reforçando a ideia de um efeito desacoplador. Na tentativa de elucidar esse mecanismo, incubamos o 3HTA na presença do atractilosídeo (ATC), um inibidor do translocador ADP/ATP (ANT), já que ácidos graxos de cadeia longa induzem desacoplamento via ANT. Observamos que o efeito desacoplador não envolve o translocador, já que a presença do ATC não preveniu a dissipação do potencial induzida pelo 3HTA.

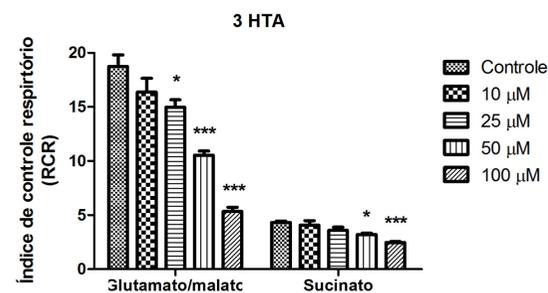
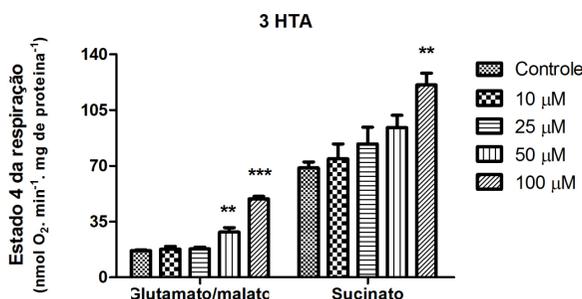
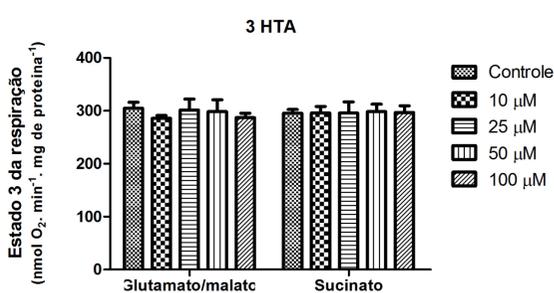


Figura 1. Consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3) em preparações mitocondriais (0,2 mg . mL⁻¹) de coração de rato usando glutamato/malato ou succinato como substratos na presença do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA, 10,25,50,100 μM). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes e estão expressos em nmol O₂ . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA de uma via).

Figura 2. Efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA, 10,25,50,100 μM) sobre o consumo de oxigênio não estimulado por ADP (estado 4) em preparações mitocondriais (0,2 mg . mL⁻¹) de coração de rato usando glutamato/malato ou succinato como substratos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes e estão expressos em nmol O₂ . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. * P < 0,05; ** P < 0,01 comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

Figura 3. Efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA, 10,25,50,100 μM) sobre a razão de controle respiratório (RCR) em mitocôndrias de coração de rato usando glutamato/malato ou succinato como substratos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para quatro experimentos independentes. * P < 0,05; ** P < 0,01 comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan).

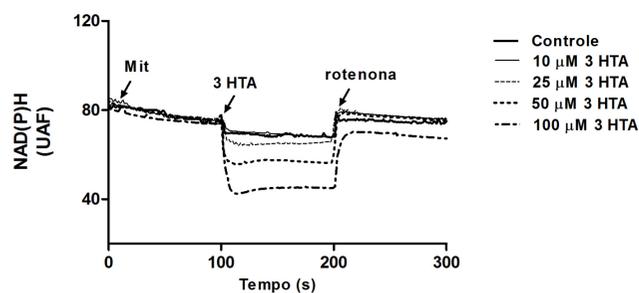


Figura 4. Efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA, 10,25,50,100 μM) sobre o conteúdo de NAD(P)H usando glutamato/malato como substratos. Mitocôndrias de coração (0,2 mg proteína . mL⁻¹) e diversas concentrações de 3HTA foram adicionadas ao meio de incubação no tempo 100s, como indicado pelas setas. No fim do experimento, rotenona (4μM) foi adicionada. Os traços representam dados de quatro experimentos diferentes e são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

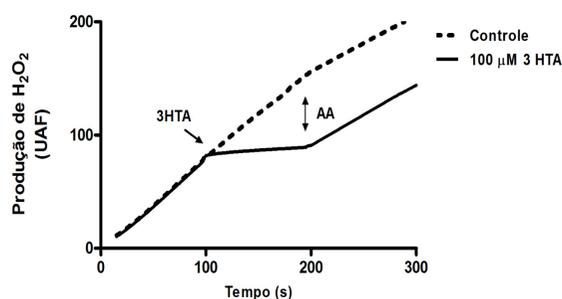


Figura 5. Efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) sobre a produção de peróxido usando succinato como substrato. Mitocôndrias de coração (0,2mg proteína . mL⁻¹) foram adicionadas ao meio de incubação no começo do experimento. O 3HTA (100 μM) foi adicionado como indicado pela seta. No fim do experimento, antimicina A (AA) (0,1 μg . mL⁻¹) foi adicionada. Os traços representam dados de quatro experimentos diferentes e são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

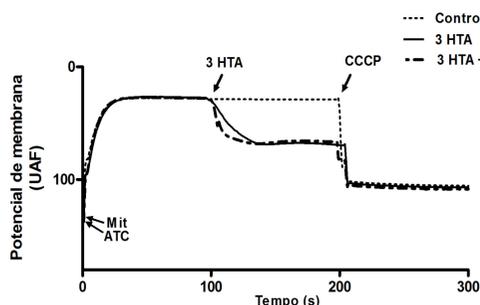


Figura 6. Efeitos *in vitro* do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3HTA, 10,25,50,100 μM) sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) em mitocôndrias de coração de rato usando glutamato/malato como substratos. Mitocôndrias de coração (0,3 mg de proteína . mL⁻¹) e várias concentrações de 3HTA foram adicionadas ao meio de incubação, assim como indicado pelas setas, na presença de 5μM de safranina O e 1μg . mL⁻¹ de oligomicina. No fim do experimento foi adicionado CCCP (1μM). Os traços representam quatro experimentos independentes e são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

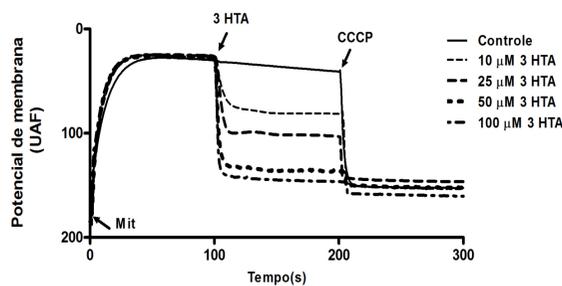


Figura 7. Efeitos *in vitro* do 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) sobre o potencial de membrana ($\Delta\psi$) em mitocôndrias de coração de rato usando glutamato/malato como substratos. Mitocôndrias de coração (0,3mg de proteína . mL⁻¹) e várias concentrações de 3HTA (10,25,50,100 μM) foram adicionadas ao meio de incubação, assim como indicado pelas setas, na presença de 5μM de safranina O e 1μg . mL⁻¹ de oligomicina. Após 100s foi adicionado atractilosídeo (ATC) ao meio de incubação e no final do experimento, CCCP (1 μM). Os traços representam quatro experimentos independentes e são expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o 3HTA, acumulado nas deficiências da MTP e LCHAD, age como desacoplador da fosforilação oxidativa, potencialmente prejudicando a homeostase mitocondrial no coração de ratos.