

O ácido pristânico, acumulado na Síndrome de Zellweger, inibe a atividade da cadeia respiratória e da Na⁺, K⁺-ATPase em cerebelo de ratos jovens



Daniele Kleemann¹, Moacir Wajner^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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



Introdução

As doenças peroxissomais, especialmente a Síndrome de Zellweger (SZ), são clinicamente caracterizadas por sintomas neurológicos, incluindo anormalidades cerebelares. Os pacientes afetados por essas desordens neurodegenerativas apresentam o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa, incluindo o ácido pristânico (Prist), no cérebro e em outros tecidos. Alguns estudos mostraram que o Prist é citotóxico para as células cerebrais mas pouco se sabe sobre a fisiopatogenia do dano cerebelar característico dos pacientes afetados pela SZ.

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do Prist em importantes parâmetros da bioenergética, como a fosforilação oxidativa e a transferência de energia intracelular, em cerebelo de ratos jovens.

Material e métodos

Homogeneizados, membranas plasmáticas sinápticas e frações mitocondriais foram obtidas a partir de cerebelos de ratos Wistar de 30 dias de vida. A atividade dos complexos da cadeia respiratória (I-IV), os níveis de ATP bem como as atividades da creatine quinase e na Na⁺, K⁺-ATPase foram investigados.

Resultado e discussão

Inicialmente, o Prist diminuiu significativamente a atividade dos complexos I-III (65 %), II (40 %) e II-III (90 %) da cadeia respiratória, sem alterar a atividade do complexo IV (Figura 1) e da creatina quinase (resultados não apresentados). Esses dados sugerem uma redução significativa da transferência de elétrons através da cadeia respiratória causada pelo Prist. Por outro lado, a transferência de energia não parece estar comprometida, destacando a seletividade do Prist para a produção de energia. Como a mitocôndria produz grande parte do ATP celular via fosforilação oxidativa, determinamos os níveis de ATP em preparações mitocondriais. Observamos que o conteúdo de ATP foi fortemente diminuído (90%), indicando que o Prist compromete a produção de energia em cerebelo de ratos jovens (Figura 2). Também foi testada a influência do Prist sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase sináptica. Observou-se que a exposição direta das preparações de membrana sináptica purificada a várias concentrações de Prist resultou em uma forte inibição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase (80 %) (Figura 3A). A Figura 3B mostra que a pré incubação do Prist (200 μM) com o homogeneizado antes da preparação da membrana sináptica não alterou a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, reforçando que a presença desse ácido graxo é crucial para o efeito inibitório sobre a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase. Por fim, observamos que o Prist causou alteração na fluidez de membranas mitocondriais (Figura 4A) e sinápticas (Figura 4B), o que pode ter contribuído para as inibições encontradas nos complexos da cadeia respiratória e na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase.

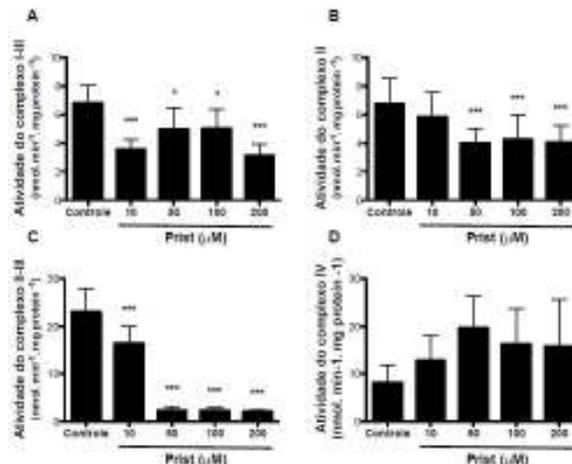


Figura 1. Efeito do ácido pristânico (Prist) na atividade dos complexos I-IV da cadeia respiratória em cerebelo de ratos. Valores são expressos em média ± desvio padrão de quatro a nove experimentos independentes (animais) por grupo. A atividade do complexo I-III (A) é expresso como nmol de citocromo c reduzido. min⁻¹. mg de proteína⁻¹ e a do complexo II (B) como nmol DCPIP reduzido. min⁻¹. mg proteína⁻¹. A atividade do complexo II-III (C) e IV (D) são expressos, respectivamente, como nmol de citocromo c reduzido. min⁻¹. mg proteína⁻¹ e nmol citocromo c oxidado. min⁻¹. mg proteína⁻¹. *P<0,05 e ***P<0,001 comparado com o controle (ANOVA seguida de Tukey).

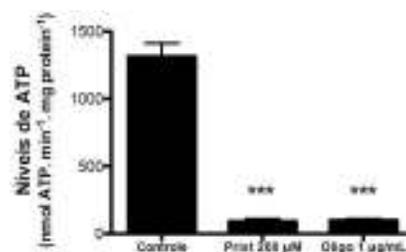


Figura 2. Efeito do ácido pristânico (Prist) sobre o conteúdo de ATP em preparações mitocondriais de cerebelos de rato usando glutamato/malato como substratos respiratórios. Valores são expressos em média ± desvio padrão de seis experimentos independentes (animais) por grupo e são expressos como nmol ATP. Min⁻¹. mg proteína⁻¹. Oligomicina A (1 μM/ml) foi usada como controle positivo. ***P<0,001 comparado ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

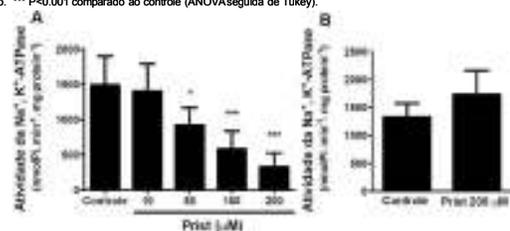


Figura 3. Efeito do ácido pristânico (Prist) sobre a atividade Na⁺, K⁺-ATPase em (A) membranas plasmáticas sinápticas purificadas de homogeneizado de cerebelo de ratos. Em alguns experimentos, o cerebelo homogeneizado foi pré incubado com Prist (200 μM) antes da purificação da membrana (B). Valores são expressos em média ± desvio padrão seis experimentos independentes (animais) por grupo e são expressos como nmol Pi. min⁻¹. mg proteína⁻¹. *P<0,05 e ***P<0,001 comparado ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

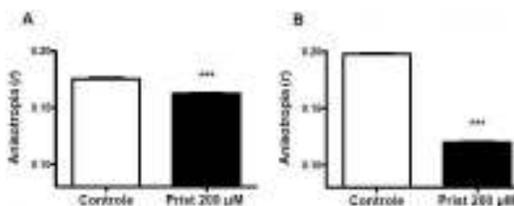


Figura 4. Efeito do ácido pristânico (Prist) sobre a fluidez da membrana em preparações de mitocôndria purificada (A) e em membranas plasmáticas sinápticas preparadas a partir de homogeneizado de cerebelo (B). Valores são expressos em média ± desvio padrão quatro experimentos independentes (animais) por grupo e são expressos como anisotropia (r). ***P<0,001 comparados com o controle (Teste t de Student para amostras pareadas).

Conclusão

Considerando a importância da fosforilação oxidativa para a homeostase mitocondrial e da Na⁺, K⁺-ATPase para a manutenção do potencial de membrana celular, o presente estudo indica que o Prist compromete a bioenergética e a neurotransmissão em cerebelo de ratos jovens.

Referências:

- Atividade dos complexos da cadeia respiratória: Cassina e Radi 1996; Fischer et al., 1985; Rustin et al., 1994
- Quantificação de ATP: Lemasters and Hackenbrock, 1976; Busanelo et al., 2013
- Atividade da creatina quinase: Huges, 1962
- Atividade da Na⁺-K⁺-ATPase: Jones e Matus, 1974
- Fluidez de membranas: Martins et al., 2006; Praet et al., 1986

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, PROPESq/UFRGS, FAPERGS, PRONEX, FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN).