

O ÁCIDO ETILMALÔNICO INDUZ A ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS

Cecatto C¹, Wajner M^{1,2}

1 - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; 2 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil



INTRODUÇÃO

Acúmulo tecidual e alta excreção urinária do ácido etilmalônico (EMA) são características bioquímicas da encefalopatia etilmalônica (EE) e da deficiência da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCADD). Embora essas patologias hereditárias sejam clinicamente caracterizadas por anormalidades neurológicas, os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral são pouco conhecidos. Considerando que uma disfunção mitocondrial e um comprometimento da homeostase do Ca²⁺ têm sido relacionados com a patogênese de doenças neurodegenerativas, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do EMA sobre vários parâmetros da bioenergética em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens na presença de Ca²⁺.

MÉTODOS

Ratos Wistar de 30 dias de vida foram mortos por decapitação, tiveram sua caixa craniana aberta e o cérebro removido, desprezando-se o bulbo olfatório e o tronco cerebral, para a obtenção das preparações mitocondriais [1]. Os parâmetros da bioenergética mitocondrial avaliados foram o potencial de membrana [2], o conteúdo de NAD(P)H [3], o inchamento [4], a produção de H₂O₂ [5] e a capacidade mitocondrial de retenção de Ca²⁺ [6] na presença de EMA e Ca²⁺ e utilizando succinato como substrato respiratório.

RESULTADOS

Verificamos que o EMA foi capaz de diminuir o potencial de membrana (Figura 1) e o conteúdo de NAD(P)H (Figura 2), além de induzir o inchamento (Figura 3) em preparações mitocondriais na presença de Ca²⁺ e utilizando succinato como substrato. No entanto, não foram detectadas alterações na produção de H₂O₂ nas mesmas condições experimentais (Figura 4). Observamos também nas figuras que os inibidores da abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial, ADP e ciclosporina, assim como o agente redutor DTT e o inibidor da captação mitocondrial de Ca²⁺ RR, foram capazes de prevenir ou atenuar esses efeitos. Finalmente, verificamos que o EMA levou a uma extensa liberação mitocondrial de Ca²⁺ (Figura 5).

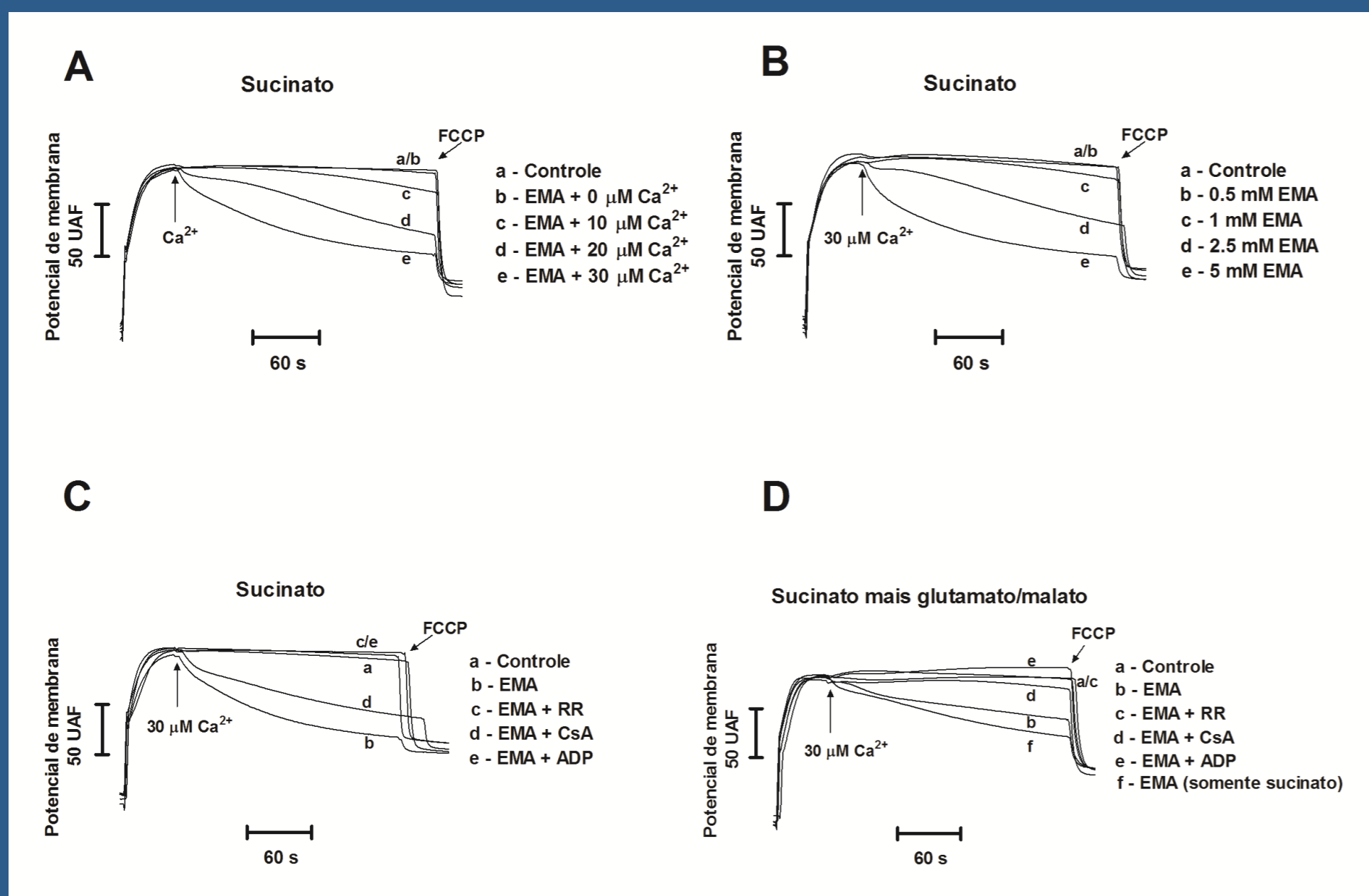


Figura 1. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) na presença ou ausência de Ca²⁺ e inibidores da transição de permeabilidade. (A) Concentrações crescentes de Ca²⁺ (traço b: 0 μ M; c: 10 μ M; d: 20 μ M; e: 30 μ M) foram adicionadas 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹ suprido por succinato mais rotenona) e 5 mM EMA. (B) Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹ suprido por succinato mais rotenona) e concentrações crescentes de EMA (traço b: 0,5 mM; c: 1 mM; d: 2,5 mM; e: 5 mM). (C) Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹ suprido por succinato mais rotenona) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ruthenium red (RR; traço c), 1 μ M ciclosporina A (CsA; traço d) ou 300 μ M ADP (traço e). (D) Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹ suprido por succinato mais glutamato mais malato) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ruthenium red (RR; traço c), 1 μ M ciclosporina A (CsA; traço d) ou 300 μ M ADP (traço e). Controles (traços a) foram realizados na ausência de EMA e com adição de 30 μ M Ca²⁺ após 50 segundos. FCCCP (1 μ M) foi adicionado no final do ensaio. Traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

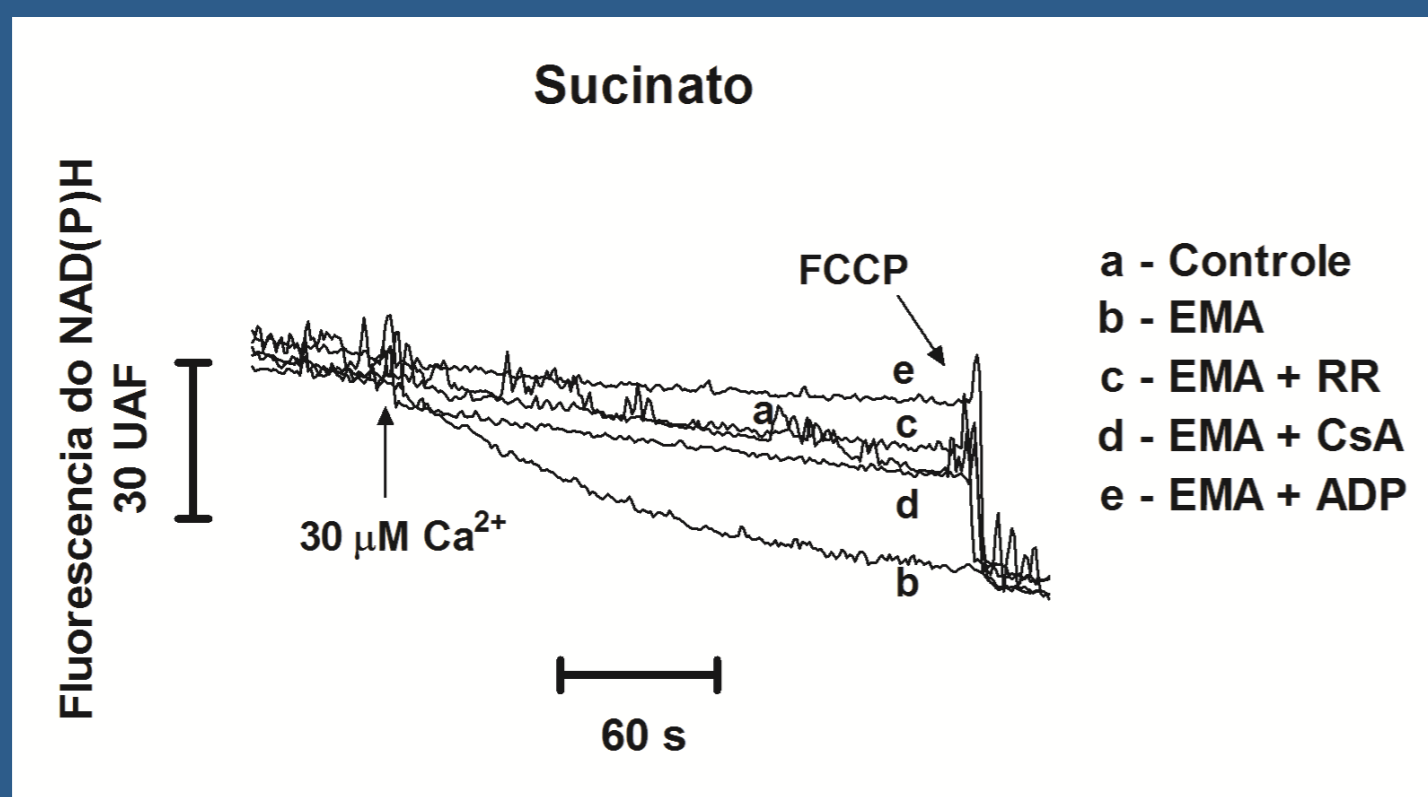


Figura 2. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre o conteúdo mitocondrial de NADH e NADPH na presença de Ca²⁺. Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ruthenium red (RR; traço c), 1 μ M ciclosporina A (CsA; traço d) ou 300 μ M ADP (traço e), usando succinato como substrato. Controle (traço a) foi realizado na ausência de EMA e com adição de 30 μ M Ca²⁺ após 50 segundos. FCCCP (1 μ M) foi adicionada no final do ensaio. Traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

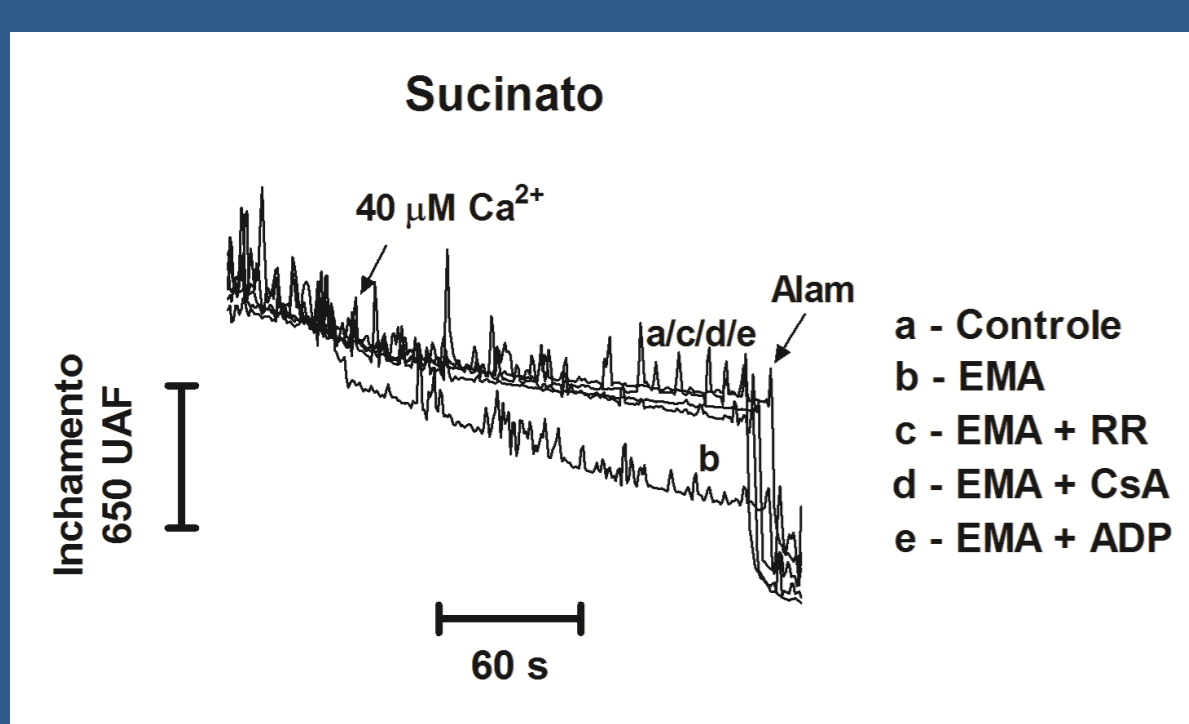


Figura 3. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre o inchamento mitocondrial na presença de Ca²⁺ e inibidores da transição de permeabilidade. Ca²⁺ (40 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ruthenium red (RR; traço c), 1 μ M ciclosporina A (CsA; traço d) ou 300 μ M ADP (traço e), usando succinato como substrato. Controle (traço a) foi realizado na ausência de EMA e com adição de 40 μ M Ca²⁺ após 50 segundos. Alameticona (Alam; 40 μ g/mg de proteína) foi adicionada no final do ensaio. Traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

CONCLUSÕES

Analisando os resultados em conjunto, concluímos que o EMA é capaz de induzir a abertura do PTP na presença de Ca²⁺, provocando fortes alterações na bioenergética mitocondrial cerebral. Presumimos, portanto, que tais efeitos deletérios podem comprometer o funcionamento do sistema nervoso central e contribuir, ao menos em parte, para explicar as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes acometidos por doenças em que o EMA se acumula.

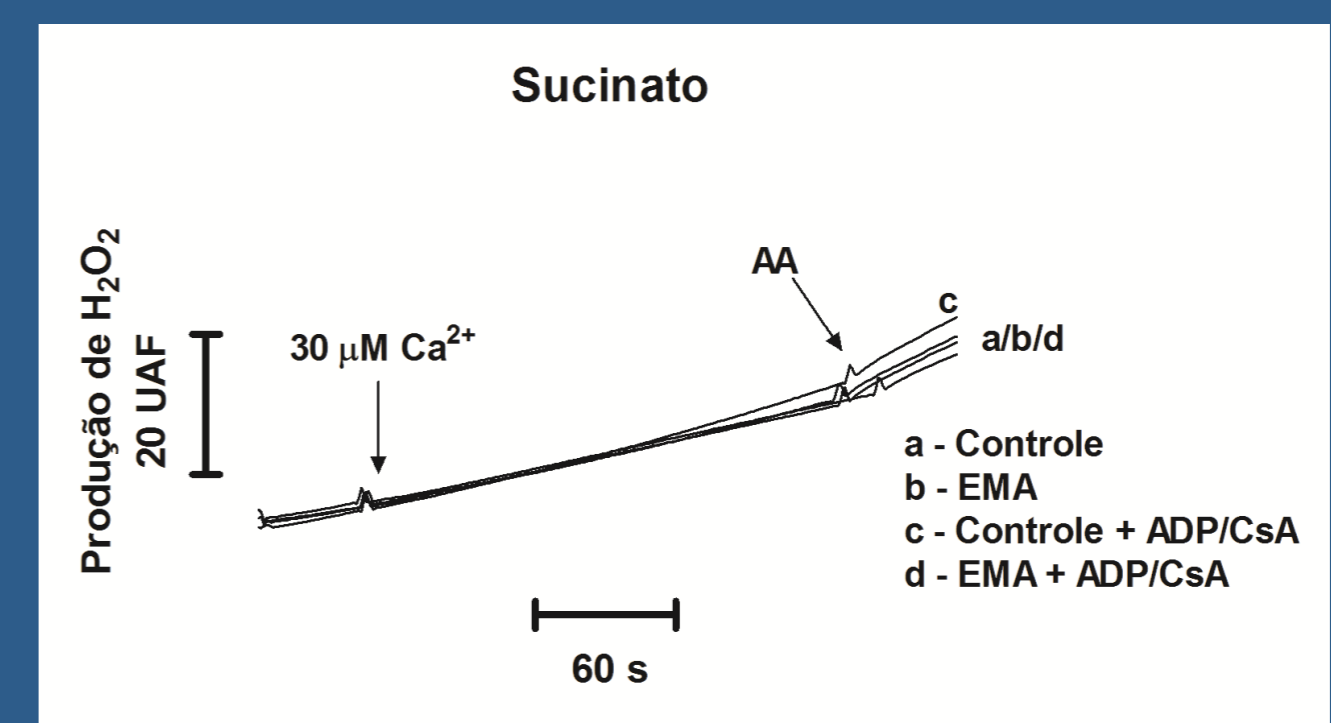


Figura 4. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a produção mitocondrial de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de Ca²⁺. Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 50 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ciclosporina A (CsA) mais 300 μ M ADP (traços c e d), usando succinato mais rotenona como substrato. Controles (traço a e c) foram realizados na ausência de EMA e com adição de 30 μ M Ca²⁺ após 50 segundos. Antimicina A (AA; 0,1 μ g/mL) foi adicionada no final do ensaio. Traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

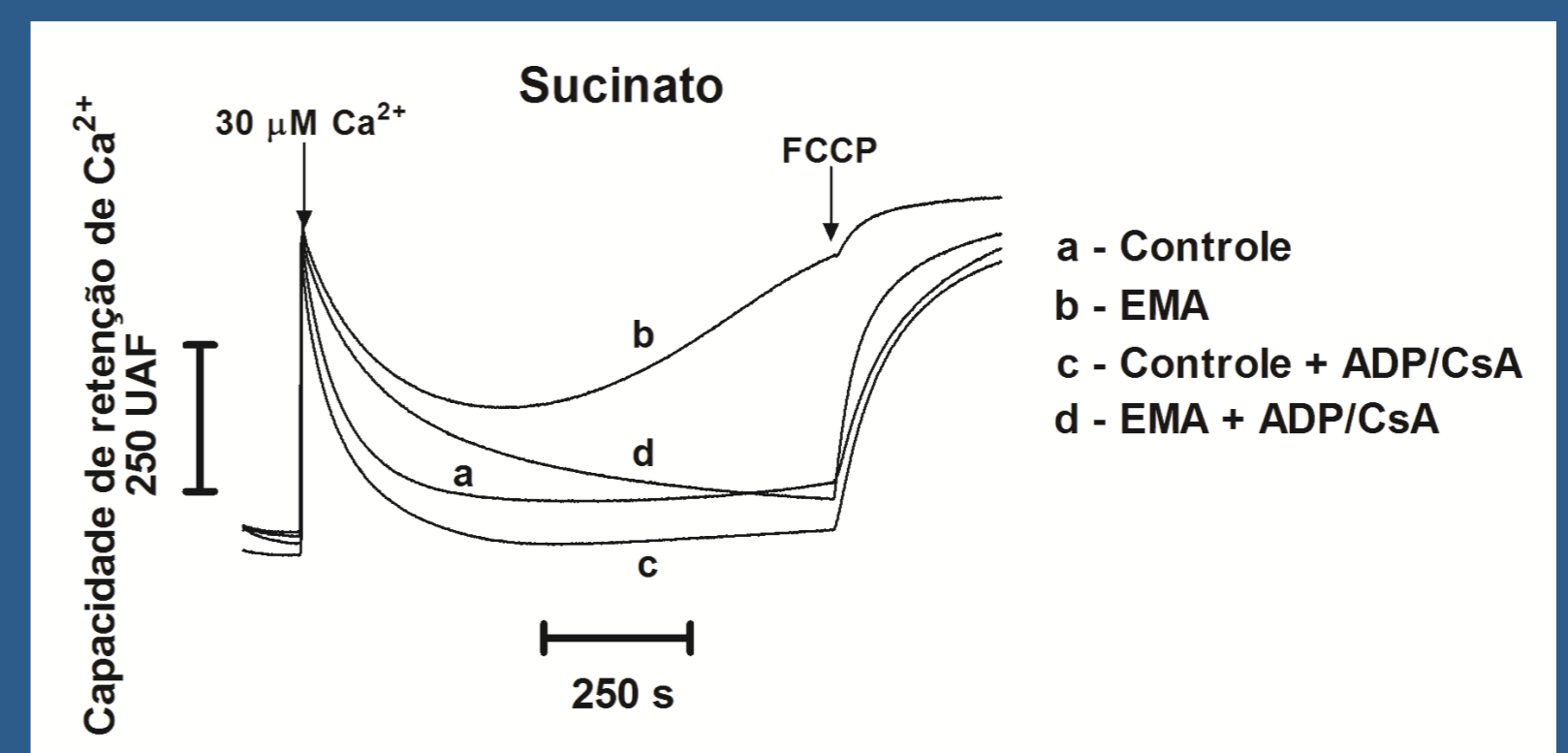


Figura 5. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a capacidade mitocondrial de retenção de Ca²⁺. Ca²⁺ (30 μ M) foi adicionado 120 segundos após o início da incubação ao meio reacional contendo 30 μ M ADP, as preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹) e 5 mM de EMA (traço b), bem como 1 μ M ciclosporina A (CsA) mais 300 μ M ADP (traços c e d), usando succinato como substrato. Controles (traço a e c) foram realizados na ausência de EMA e com adição de 30 μ M Ca²⁺ após 120 segundos. FCCCP (1 μ M) foi adicionado no final do ensaio. Traços são representativos de três experimentos independentes (animais) e foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

REFERÊNCIAS

- [1] Rosenthal et al., 1987. *Flow Metab* 7, 752-8
- [2] Akerman e Wikstrom, 1976. *FEBS lett* 68, 191-7
- [3] Schuck et al., 2010. *Life Sci*. 87, 139-46
- [4] Maciel et al., 2004. *J Neurochem* 90:1025-1035
- [5] Mohanty et al., 1997. *J Immunol Methods*. 202, 133-41
- [6] Saito e Castilho, 2010. *Neurochem Res* 35:1667-1674