

# Evidência experimental de que ácidos graxos acumulados na deficiência da atividade da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD) prejudicam a respiração mitocondrial em coração, fígado e cérebro de ratos jovens

Lucas Henrique Rodrigues da Silva<sup>1</sup>; Moacir Wajner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil



## INTRODUÇÃO

A deficiência da atividade da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD) é a doença mais frequente da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (14 a 20 carbonos). Essa enfermidade é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo tecidual predominante dos ácidos mirístico (Myr – C14:0) e cis-5-tetradecênico (Cis-5 – C14:1). Os pacientes frequentemente apresentam cardiomiopatia, hepatopatia e rabdomiólise, bem como disfunção neurológica, especialmente durante crises catabólicas.

## MÉTODOS

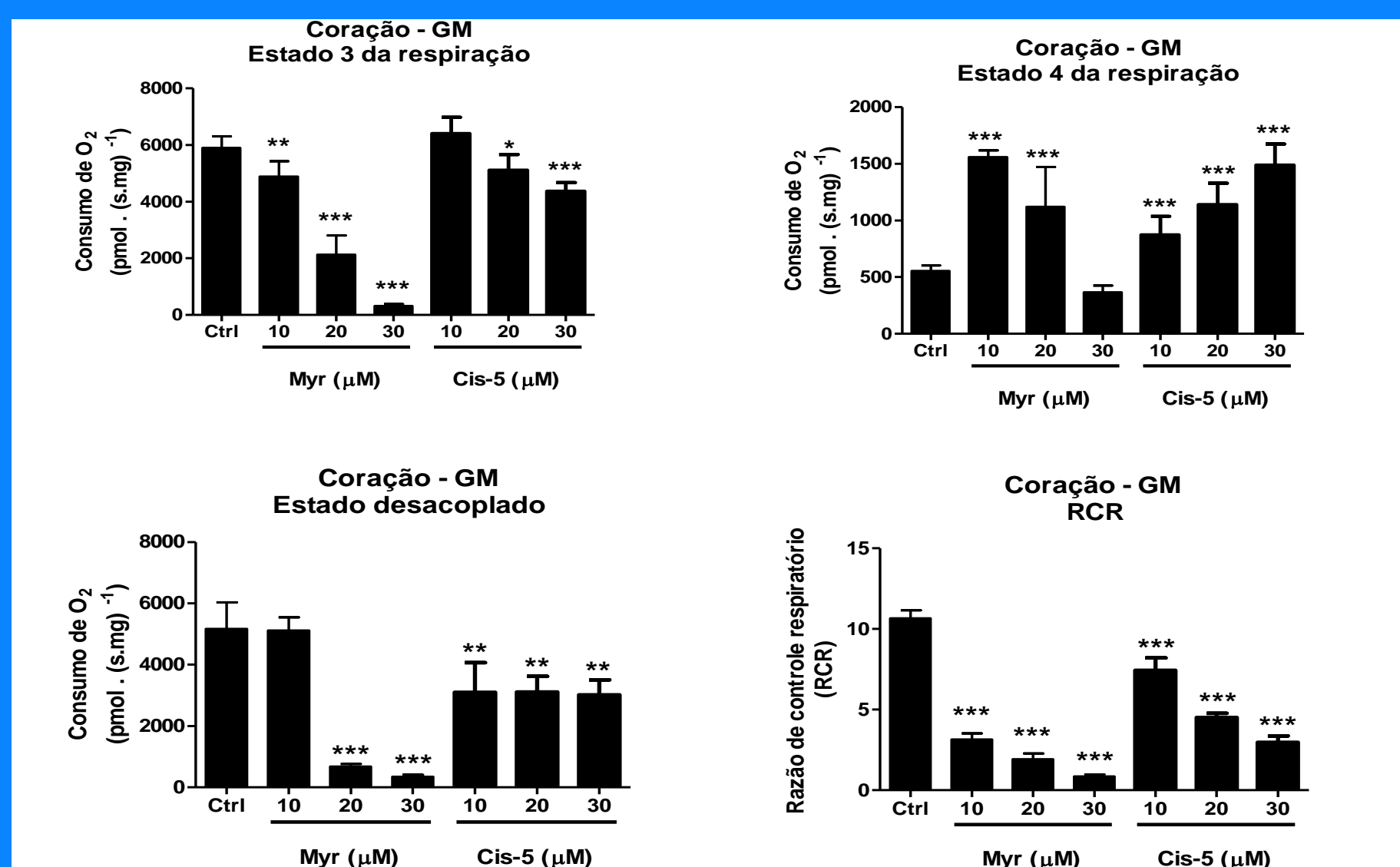
Considerando que a patogênese dessa doença ainda não está bem estabelecida, investigamos os efeitos *in vitro* do Myr e Cis-5 sobre importantes parâmetros da respiração mitocondrial em organelas de coração, fígado e cérebro de ratos. As preparações mitocondriais foram obtidas dos diferentes tecidos de ratos Wistar de 30 dias de vida. Os parâmetros avaliados foram o estado 3 (estimulado por ADP), estado 4 (respiração de repouso, estimulado pela oligomicina), estado desacoplado (estimulado por CCCP) e a razão de controle respiratório, medidos pelo consumo de oxigênio.

## RESULTADOS

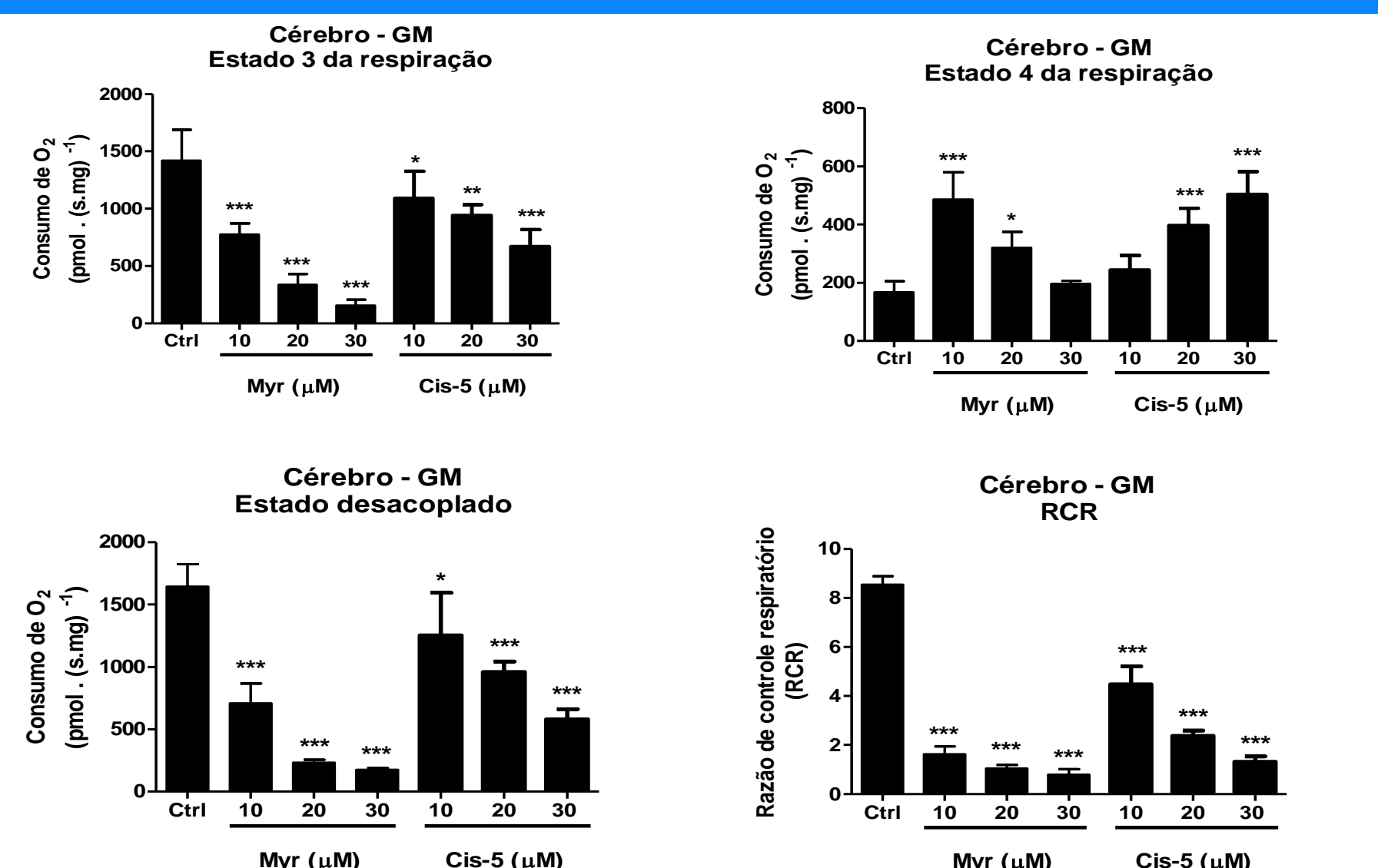
O Myr aumentou o estado 4 da respiração em mitocôndrias de todos os tecidos, enquanto que o Cis-5 somente alterou esse parâmetro em cérebro, indicando que esses ácidos graxos se comportam como desacopladores da fosforilação oxidativa. O inibidor do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT), carboxiatractilósido (CAT), foi capaz de prevenir essas alterações, indicando o envolvimento do ANT. Além disso, o Myr, e de forma menos intensa o Cis-5, diminuíram os estados 3 e desacoplado em mitocôndrias de todos os tecidos testados, indicando inibição metabólica. Observou-se também que essa inibição metabólica induzida pelo Myr é mais evidente com substratos ligados ao NADH (glutamato e malato) do que ao FADH<sub>2</sub> (sucinato) em mitocôndrias de coração de ratos.

## CONCLUSÕES

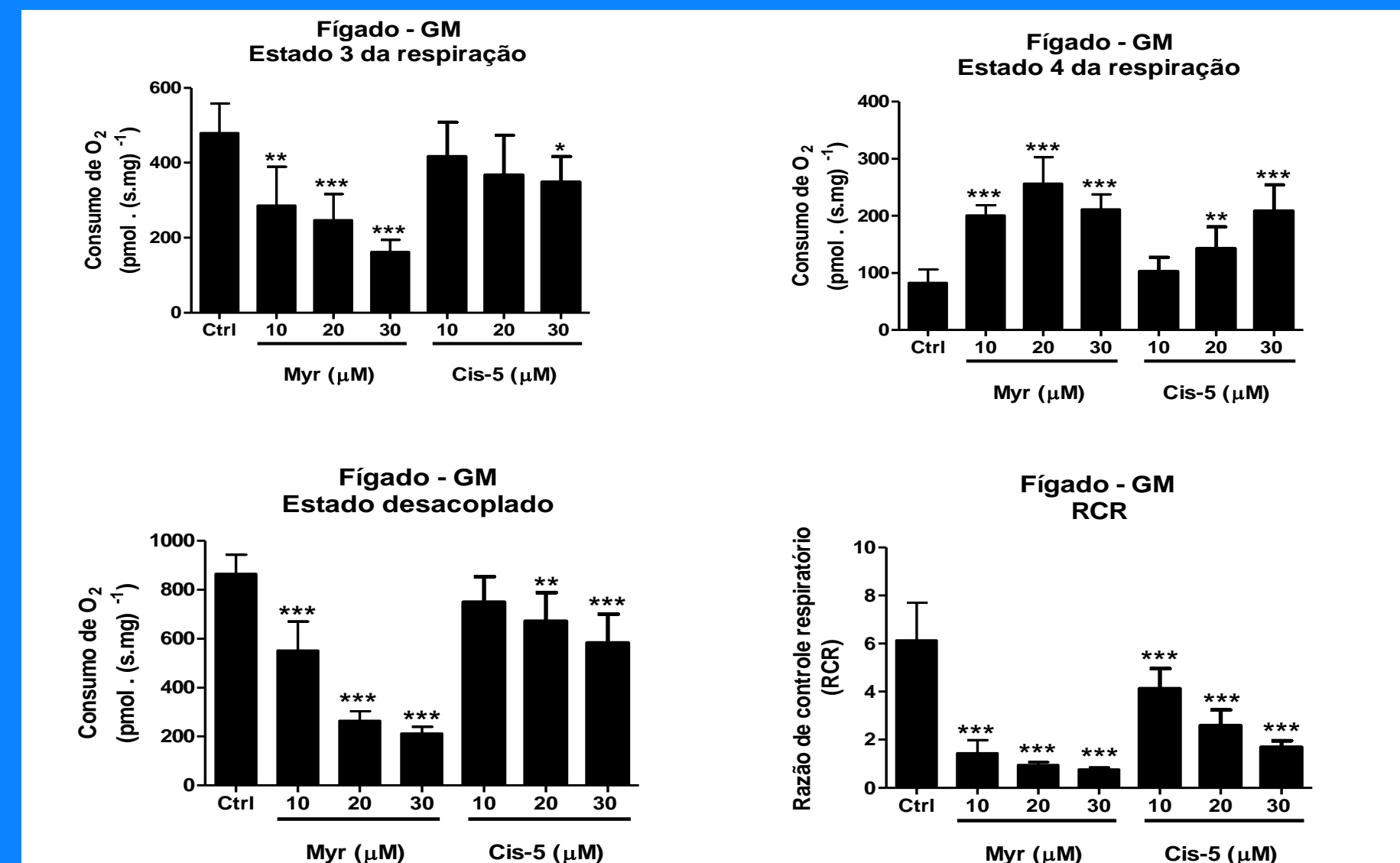
Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que o Myr é mais tóxico sobre a atividade respiratória mitocondrial se comparado ao Cis-5, atuando como desacoplador e inibidor metabólico da fosforilação oxidativa. Pode-se, portanto, presumir que essa lipotoxicidade contribui para a disfunção bioenergética e isso representa um importante patomecanismo em pacientes com a deficiência da VLCAD.



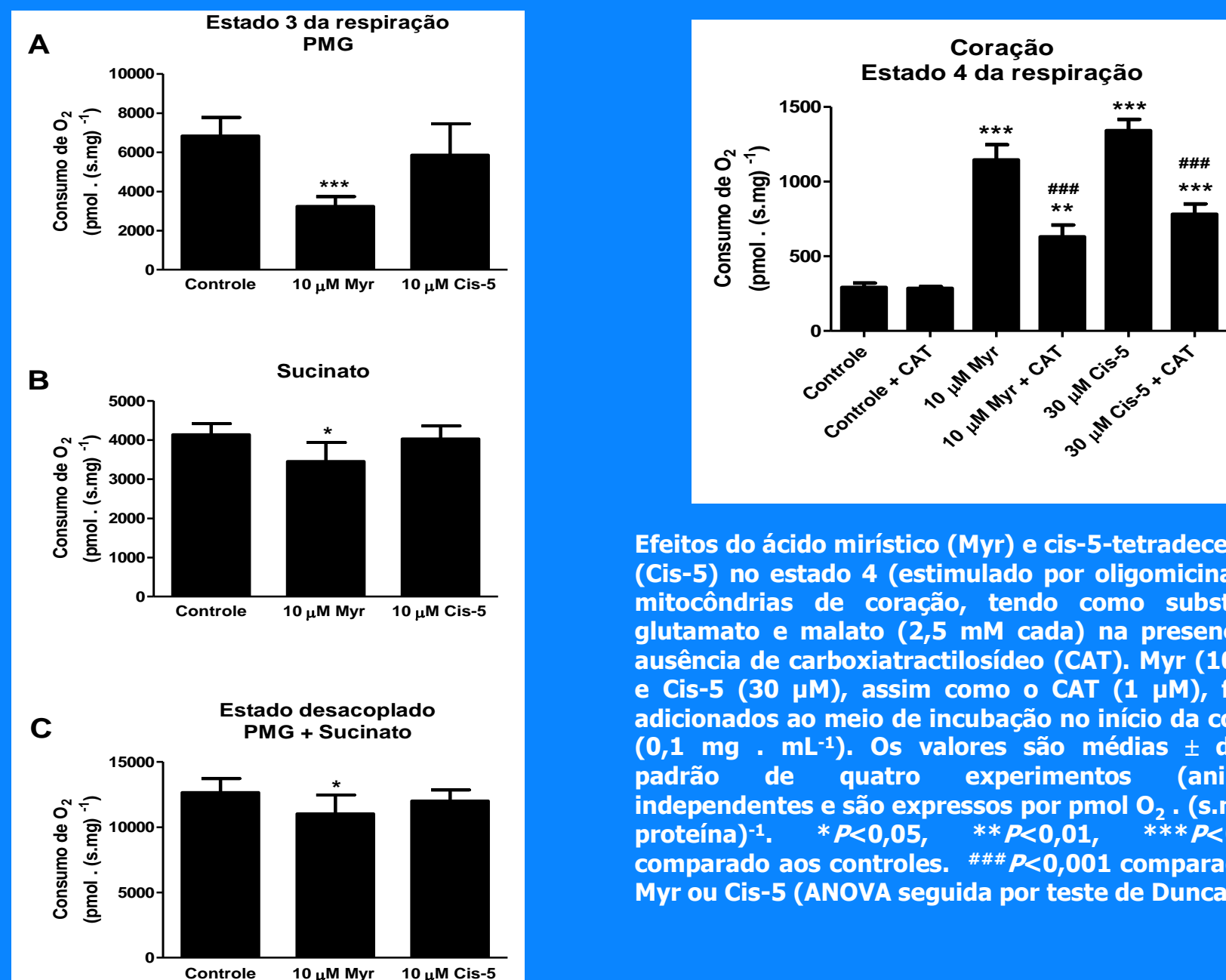
Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecênico (Cis-5) no estado 3 (estimulado por ADP), estado 4 (estimulado por oligomicina), razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (estimulado por CCCP) em mitocôndrias de coração, tendo como substratos glutamato e malato (2,5 mM cada). Myr e Cis-5 (10-30  $\mu$ M) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL<sup>-1</sup>). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O<sub>2</sub> . (s.mg de proteína)<sup>-1</sup>. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado aos controles (ANOVA seguida por teste de Duncan).



Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecênico (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 cérebro, tendo como substratos glutamato e malato (2,5 mM cada). Myr e Cis-5 (10-30  $\mu$ M) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL<sup>-1</sup> de proteína). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O<sub>2</sub> . (s.mg de proteína)<sup>-1</sup>. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado aos controles (ANOVA seguida por teste de Duncan).



feitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecênico (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 fígado, tendo como substratos glutamato e malato (2,5 mM cada). Myr e Cis-5 (10-30  $\mu$ M) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL<sup>-1</sup>). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O<sub>2</sub> . (s.mg de proteína)<sup>-1</sup>. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado aos controles (ANOVA seguida por teste de Duncan).



Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecênico (Cis-5) no estado 4 (estimulado por oligomicina) em mitocôndrias de coração, tendo como substratos glutamato e malato (2,5 mM cada) na presença ou ausência de carboxiatractilósido (CAT). Myr (10  $\mu$ M) e Cis-5 (30  $\mu$ M), assim como o CAT (1  $\mu$ M), foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida (0,1 mg . mL<sup>-1</sup>). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos (animais) independentes e são expressos por pmol O<sub>2</sub> . (s.mg de proteína)<sup>-1</sup>. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado aos controles. ###P<0,001 comparado ao Myr ou Cis-5 (ANOVA seguida por teste de Duncan).

Figura 5. Efeitos do ácido mirístico (Myr) e cis-5-tetradecênico (Cis-5) em parâmetros respiratórios medidos pelo consumo de oxigênio em mitocôndrias de coração, utilizando o protocolo SUIT. (A) Estado 3 ligado ao complexo I (Estimulado por ADP), (B) Estado 3 ligado ao complexo II (estimulado por ADP) e (C) Estado desacoplado ligado aos complexos I e II (Estimulado por CCCP). Piruvato (5 mM), glutamato (10 mM) mais malato (0,5 mM), (PMG), e succinato (SUC, 10 mM) foram usados como substratos. As preparações mitocondriais (0,1 mg de proteína . mL<sup>-1</sup>) e Myr ou Cis-5 (10  $\mu$ M) foram adicionados ao meio de incubação no início da corrida. Os controles foram feitos na ausência de ácidos graxos. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de cinco a sete experimentos independentes (animais) e são expressos por pmol O<sub>2</sub> . s<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>. \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001, comparado aos controles. (ANOVA seguida por teste de Duncan).

## REFERÊNCIAS

- [1] Rosenthal et al., 1987. *Flow Metab* 7, 752-8
- [2] Amaral, et al., 2016. *J Neurochem* 137(1):, 62-75;
- [3] Akerman e 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.