

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**LUANA MATIAS PEREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO EM SORO E**  
**LÍQUOR DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS A UM MODELO**  
**ANIMAL DE DEFICIÊNCIA DE MCAD**

**CRICIÚMA, 07 DE NOVEMBRO 2011**

---

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO EM SORO E LÍQUOR DE  
RATOS JOVENS SUBMETIDOS A UM MODELO ANIMAL DE DEFICIÊNCIA  
DE MCAD**

---

**Luana Matias Pereira<sup>1,2</sup>**

**Mairis Biella<sup>2</sup>**

**Samara Fenilli Bristot<sup>2</sup>**

**Patrícia Fernanda Schuck<sup>1,2</sup>**

**Carolina Maso Viegas<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor responsável: Carolina Maso Viegas

Email: carolinamviegas@gmail.com

Endereço: UNESC- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105-  
Bloco S- Sala 6, Bairro Universitário, Criciúma, SC, Brasil – CEP: 88806-000

**Páginas: 17**

**Figuras: 3**

## RESUMO

A deficiência da desidrogenase acil-CoA de cadeia média (MCAD) é o mais frequente defeito de beta-oxidação de ácidos graxos. Indivíduos afetados por esse distúrbio apresentam-se sintomáticos durante período de descompensação metabólica, caracterizado pela hipoglicemia e acúmulo de ácidos graxos de cadeia média, sendo os principais os ácidos octanóico (AO), decanóico (AD) e *cis*-4-decenóico. Durante as crises, o paciente pode apresentar episódios de vômitos, letargia, apneia e coma, podendo levar à morte súbita. Cronicamente, os pacientes apresentam atraso no desenvolvimento psicomotor, rabdomiólise, paralisia cerebral, retardo no crescimento, problemas comportamentais e dificuldade de atenção. No presente estudo avaliamos a influência dos dois principais ácidos graxos acumulados na deficiência de MCAD, AO e AD, através da indução de um modelo químico deste distúrbio metabólico. Ratos Wistar machos de 30 dias de vida foram divididos em três grupos (controle, AO e AD). Os animais receberam uma única administração de solução salina, AO (5  $\mu\text{mol/g}$ ) ou AD (5  $\mu\text{mol/g}$ ) e foram mortos 12 ou 24 horas após a administração. Foram realizadas as determinações dos níveis de glicose, proteínas totais e albumina em soro e líquido dos animais. Inicialmente observamos que o acúmulo dos metabólitos alterou os níveis de glicose no soro e líquido dos animais 24 horas após a administração de ambos os ácidos graxos (AO e AD), sendo um aumento significativo no líquido e uma diminuição no soro, o que corrobora com os achados laboratoriais encontrados nos pacientes com deficiência de MCAD em relação aos níveis séricos. Avaliamos também os níveis de albumina e proteína totais, sendo que ambos os metabólitos não causaram alterações significativas no líquido e soro dos ratos. Com a obtenção destes resultados, podemos observar que a hipoglicemia apresentada nos animais submetidos a este modelo de

deficiência da MCAD mimetiza os achados laboratoriais encontrados nos pacientes afetados por esta doença, o que indica que este modelo pode ser útil para melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos que levam aos achados clínicos característicos dos pacientes com deficiência de MCAD.

## **INTRODUÇÃO**

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD) é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva, sendo o mais frequente dos defeitos de beta-oxidação, com prevalência de 1:10.000-15.000 nascidos vivos (GHISLA, 2004). Indivíduos com a deficiência de MCAD não possuem a capacidade de oxidar ácidos graxos de cadeia média, ocasionando o acúmulo destes e de seus derivados no sangue e em outros tecidos, bem como na urina dos pacientes (ROE & DING, 2001).

Os pacientes afetados pela deficiência de MCAD apresentam uma variabilidade de seguintes sinais e sintomas, incluindo episódios de vômitos, letargia, apneia e coma, podendo levar à morte súbita (GROSSE et al., 2006). Também podem apresentar cronicamente atraso no desenvolvimento psicomotor, rabdomiólise, paralisia cerebral, retardo no crescimento, problemas comportamentais e dificuldade de atenção (ROE & DING, 2001). Os indivíduos com este erro inato do metabolismo normalmente começam a desenvolver sintomas na infância, entre dois meses e dois anos de idade, embora o início dos sintomas possa ocorrer ao longo da vida adulta. As crianças são geralmente assintomáticas, exceto em jejum prolongado e momentos de estresse metabólico, geralmente associado à infecção viral ou bacteriana (KOMPARE & RIZZO, 2008).

Os principais metabólitos acumulados são os ácidos graxos de cadeia média, ácido octanóico (AO), ácido decanóico (AD) e ácido *cis*-4-decenóico (AcD), que caracterizam bioquimicamente a deficiência de MCAD. A concentração plasmática destes metabólitos em pessoas normais varia entre 0-2  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto que nos pacientes sintomáticos varia entre 34-515  $\mu\text{mol/L}$  (ONKENHOUT et al., 1995).

Os indivíduos com deficiência de MCAD podem apresentar sintomas clínicos com hepatomegalia, hipoglicemia, hiperamonemia e aumento de transaminases (ERNA & CORNEJO, 2007). A síntese diminuída de corpos cetônicos durante o jejum é uma característica da deficiência de MCAD, fazendo com que aumente a importância da glicose sanguínea como fonte de energia celular, ocasionando hipoglicemia nos pacientes. Outra consequência da não utilização dos ácidos graxos de cadeia média na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo de acil-CoA de ácido graxo de cadeia média dentro das mitocôndrias, causando a inibição das enzimas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que utilizam coenzima A como substrato (ROE & DING, 2001).

O tratamento de MCAD consiste em uma dieta rica em carboidratos e uma ingestão diminuída de ácidos graxos, evitar jejum e outras situações de catabolismo aumentado, tais como infecções virais, além de infusão de glicose durante as crises metabólicas (ROE & DING, 2001). Além disso, a L-carnitina é um suplemento que pode ser utilizado por estes indivíduos, pois esta se liga a ácidos orgânicos, permitindo assim sua excreção na forma de acilcarnitinas (ROE & DING, 2001).

Estudos *in vitro* recentes demonstraram que os ácidos graxos acumulados nesta deficiência, AO, AD e AcD, inibem importantes parâmetros do metabolismo energético em cérebro, fígado e músculo esquelético de ratos jovens, incluindo as atividades de complexos da cadeia respiratória, das enzimas creatina quinase e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, bem

como a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose, acetato e citrato (ASSIS et al., 2003, 2004, 2006), além de alterar parâmetros respiratórios e estado redox em mitocôndrias isoladas (SCHUCK et al., 2009). Também foi demonstrado que os mesmos ácidos graxos induzem estresse oxidativo, como observado pela indução de lipoperoxidação e dano oxidativo a proteínas, e ainda uma diminuição das defesas antioxidantes não enzimáticas em cérebro de ratos (SCHUCK et al., 2007, 2009).

Considerando que os mecanismos fisiopatológicos dos danos teciduais apresentados por pacientes acometidos pela deficiência de MCAD ainda não estão bem estabelecidos, o objetivo deste estudo foi determinar os níveis de glicose, proteínas totais e albumina em líquido e soro de ratos jovens submetidos a um modelo *in vivo* que mimetiza os níveis de AO e AD, através de uma única injeção subcutânea desses ácidos graxos, para assim avaliar o *status* bioquímico desses animais.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Reagentes*

Os reagentes foram adquiridos das empresas Labtest®, Analisa® e Sigma Chemical Co. Os ácidos octanóico e decanóico foram dissolvidos em solução salina 0,9% e o pH foi ajustado para 7,4.

### *Animais*

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos de 30 dias de vida fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de  $\pm 12$  horas a uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , com livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de

Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais e o seu sofrimento.

#### *Modelo animal e preparo da amostra*

Os animais foram submetidos a uma única injeção de AO (5  $\mu\text{mol/g}$ ) ou AD (5  $\mu\text{mol/g}$ ) ou solução salina (NaCl: 0,9 %) (grupo controle). Doze ou vinte quatro horas após a administração dos metabólitos, os animais sofreram mortos por decapitação com guilhotina e sem anestesia. O sangue foi coletado e centrifugado (4.000 rpm por 10 min) para a obtenção do soro. O líquido foi obtido por meio de punção na cisterna com uma agulha número 23G. O líquido e o soro foram armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento das determinações bioquímicas.

#### *Determinações bioquímicas*

Avaliaram-se os níveis de glicose, proteínas totais e albumina no soro e no líquido dos animais que foram submetidos ao modelo *in vivo*. O líquido e o soro coletados foram avaliados de acordo com o protocolo experimental fornecidos pelos kits comerciais produzidos pelas empresas Labtest® e Analisa®.

#### *Análise estatística*

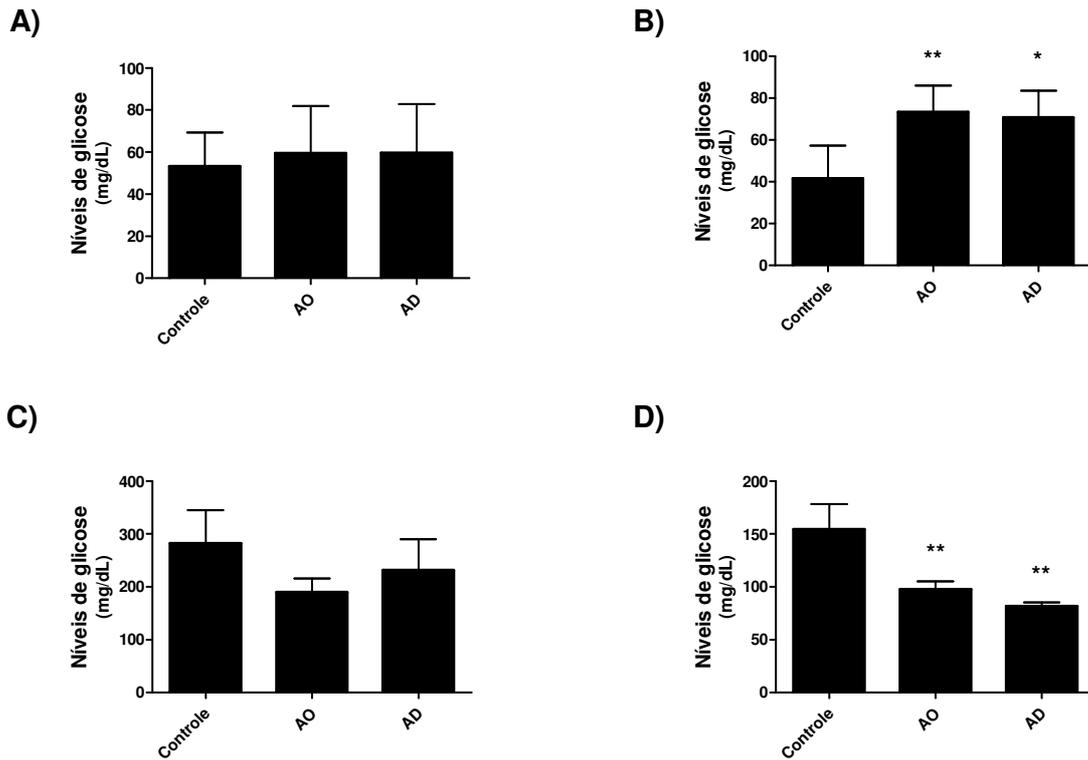
Os dados foram avaliados através de análise de variância de uma via (ANOVA) seguidos pelo teste post-hoc de Duncan quando o *P* foi significativo. As análises foram

feitas pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 utilizando-se um PC compatível. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de  $P \leq 0,05$ .

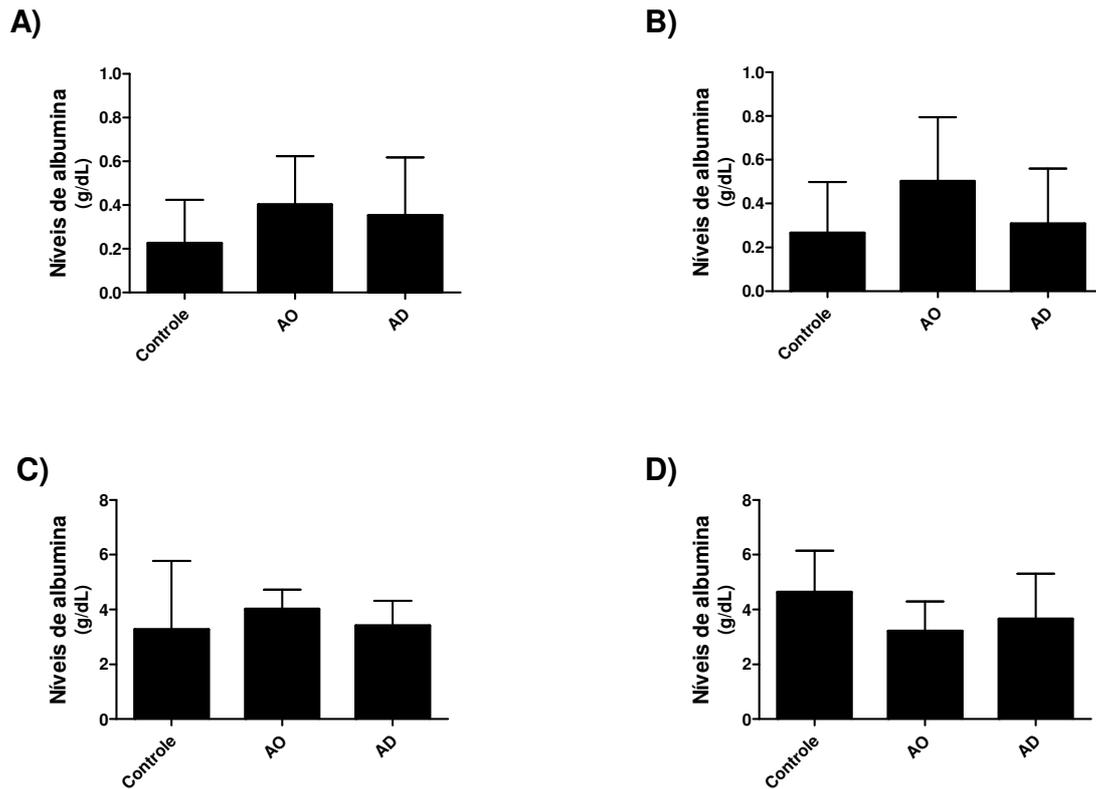
## RESULTADOS

Foram avaliados os níveis de glicose no soro e no líquido dos animais submetidos ao modelo de MCAD através da injeção de AO ou AD. Os níveis de glicose no líquido 12 horas após a administração dos ácidos graxos não tiveram diferença significativa quando comparado com os valores do grupo controle (Fig. 1A). Entretanto, os níveis de glicose no líquido 24 horas após a administração dos ácidos graxos apresentaram-se aumentados de forma significativa nos grupos AO (76,7%) e AD (70,2%), quando comparados ao grupo controle [ $F(2, 12) = 8,613$ ;  $P < 0,01$ ] (Fig. 1B). Também se pode observar nas figuras 1C e 1D que houve uma diminuição significativa nos níveis séricos de glicose apenas 24 h após a administração dos ácidos graxos (AO: 64,71% e AD: 52,78 %), quando comparado ao grupo controle [ $F(2, 8) = 2,80$ ;  $P < 0,01$ ] no entanto não foi observado nenhuma alteração significativa 12 h após a injeção dos metabólitos.

Por outro lado, como podemos observar nas figuras 2 e 3, não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis de albumina e proteínas totais, respectivamente, em líquido e soro dos animais, tanto 12 h quanto 24 h após a administração de AO e AD.

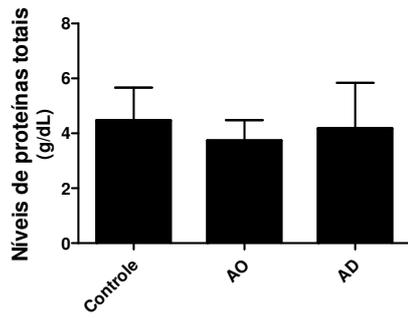


**Figura 1.** Efeitos *in vivo* do acúmulo do ácido octanóico (AO) e do ácido decanóico (AD) sobre os níveis de glicose no líquor (A e B) e soro (C e D), 12 h (A e C) ou 24 h (B e D) após a administração dos ácidos graxos em ratos jovens. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão para quatro a seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em mg/dL. ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  em comparação com o grupo controle.

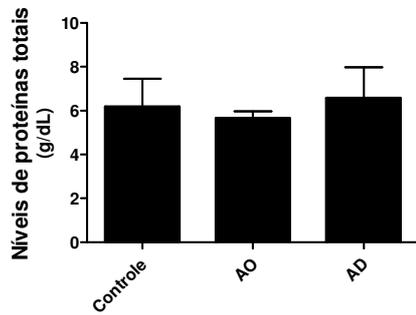


**Figura 2.** Efeitos *in vivo* do acúmulo do ácido octanóico (AO) e do ácido decanóico (AD) sobre os níveis de albumina no líquido (A e B) e soro (C e D), 12 h (A e C) ou 24 h (B e D) após a administração dos ácidos graxos em ratos jovens. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão para quatro a seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em mg/dL. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais (ANOVA de uma via).

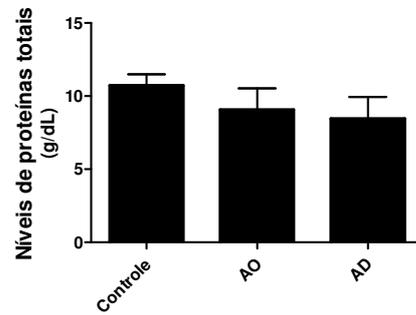
**A)**



**B)**



**C)**



**Figura 3.** Efeito *in vivo* de acúmulo do ácido octanóico (AO) e do ácido decanóico (AD) sobre os níveis de proteínas totais no líquido (A) e soro (B e D), 12 h (A e B) ou 24 h (C) após a administração dos ácidos graxos em ratos jovens. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos experimentais (ANOVA de uma via).

## DISCUSSÃO

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD) é um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes, tendo sua prevalência estimada em 1:10.000-15.000 nascidos vivos (GHISLA, 2004). As manifestações clínicas dos portadores dessa doença acometem principalmente o sistema nervoso central, podendo levar um número significativo de pacientes com morte súbita. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral que acomete os pacientes portadores da deficiência de MCAD. Os achados laboratoriais em pacientes com deficiência de MCAD podem ser hipoglicemia, hiperamonemia, aumento de transaminases (ERNA & CORNEJO, 2007). Apesar de alguns autores apontarem a hipoglicemia e a síntese diminuída de corpos cetônicos como as principais causas do dano neurológico, a hipótese de que efeitos tóxicos causados pelos ácidos graxos acumulados na deficiência de MCAD estejam envolvidos vem sendo crescentemente considerada (GREGERSEN et al., 2008).

Neste sentido, alguns estudos demonstraram efeitos tóxicos dos AO, AD e AcD os principais ácidos graxos acumulados na deficiência de MCAD (ROE & DING, 2001). Foi verificado que a administração *in vivo* de AO e AD altera o transporte de ácidos orgânicos no plexo coróide, levando a um prejuízo na depuração deste ácido graxo e de outros compostos (KIM et al., 1984). Acredita-se que este efeito contribua para o acúmulo de ácidos graxos de cadeia média no cérebro e no líquido céfalo-raquidiano de pacientes afetados pela deficiência de MCAD. Também se observou que o AO inibe o controle do volume astrocitário e a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cultura de células gliais (OLSON et al., 1989), o que poderia estar relacionado ao edema cerebral observado na doença. Demonstrou-se também que o AO causa um aumento no consumo

de O<sub>2</sub> e na produção de CO<sub>2</sub>, sem causar um correspondente aumento na produção de ATP em fígado de ratos, indicando que esse metabólito poderia provocar uma disfunção mitocondrial (BERRY et al., 1983; SCHOLZ et al., 1984).

Mais recentemente, foi demonstrado que os AO, AD e AcD inibem *in vitro* importantes parâmetros do metabolismo energético em cérebro de ratos jovens, tais como as atividades de complexos da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas creatina quinase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, bem como a produção de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de [U-<sup>14</sup>C]glicose, [1-<sup>14</sup>C]acetato e [U-<sup>14</sup>C] citrato (ASSIS et al., 2003, 2004; ASSIS, 2006), corroborando uma alteração na homeostasia mitocondrial do cérebro na presença destes ácidos graxos.

Nosso trabalho teve por objetivo, avaliar alguns parâmetros bioquímicos para melhor compreender os processos que levam aos achados laboratoriais dos pacientes afetados pela deficiência da MCAD, especialmente a hipoglicemia, e assim validar um modelo químico desta desordem através da administração de uma única injeção de AO ou AD.

Nosso principal achado foi uma diminuição significativa dos níveis séricos de glicose e ainda um aumento nos níveis de glicose no líquido dos animais submetidos ao modelo de deficiência de MCAD. A beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos é a principal fonte de energia para a síntese de ATP em períodos de jejum. Este processo gera acetil-coenzima A (CoA) e energia na forma de ATP. A rota de oxidação dos ácidos graxos é complexa e inclui muitos passos: captação celular de ácidos graxos, ativação desses mesmos ácidos graxos a ésteres acil-CoA, trans-esterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial, re-esterificação a acil-CoA, e a espiral da beta-oxidação intramitocondrial, que fornece elétrons para flavoproteínas transferidoras de elétrons e acetil-CoA. Cada etapa da espiral de

oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo (SMITH et al, 2005). A síntese diminuída de corpos cetônicos durante o jejum é uma característica da deficiência de MCAD, fazendo com que aumente a importância da glicose sanguínea como fonte de energia celular, ocasionando hipoglicemia nos pacientes. Outra consequência da não utilização dos ácidos graxos de cadeia média na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo de acil-CoA de ácido graxo de cadeia média dentro das mitocôndrias, causando a inibição das enzimas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que utilizam coenzima A como substrato. Assim, ocorre diminuição da conversão do piruvato a acetil-CoA e diminuição na velocidade do ciclo do ácido cítrico, visto que a síntese do citrato e a conversão do  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA também estão diminuídas. Além disso, a succinil-CoA ligase é inibida pelo ácido octanóico e também por intermediários de acil-CoA. Com a baixa produção de acetil-CoA, há diminuição da síntese de citrato. O citrato, por sua vez, é precursor de malato, substância necessária para a produção de glicose, via gliconeogênese, e precursor de malonil-CoA, o principal regulador inibitório da CPTI, enzima responsável pela entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria. Portanto, a diminuição dos níveis de citrato ocasionada pelo acúmulo do octanoato e outros ácidos graxos na deficiência de MCAD provoca também uma diminuição da gliconeogênese e um aumento da entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria, o que deve ser um agravante para a hipoglicemia e deve provocar o acúmulo de derivados de acil-CoA graxos nos pacientes (ROE & DING, 2001). Portanto a hipoglicemia apresentada nos animais submetidos a este modelo de deficiência da MCAD mimetiza os achados laboratoriais encontrados nos pacientes afetados por esta doença.

Por outro lado os níveis de glicose no líquido mostraram-se significativamente aumentados o que reflete a quantidade de glicose que chega às células cerebrais. Este achado não parece estar bem esclarecido, uma hipótese que pode ser levantada é que algum mecanismo pode estar inibindo a passagem de informações para o cérebro quanto à falta de glicose na corrente sanguínea. Uma avaliação da barreira hemato-encefálica neste modelo poderia ser de grande importância para melhor esclarecer os resultados encontrados, e ainda avaliar se ocorre alguma alteração na expressão e/ou afinidade e/ou atividade dos transportadores de glicose.

As alterações observadas neste trabalho mimetizam um dos principais achados bioquímicos presente na deficiência de MCAD, a hipoglicemia. Portanto este modelo quimicamente induzido desta desordem, através da administração de AO e AD, pode ser de grande utilidade para melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos que levam aos achados clínicos característicos dos pacientes afetados pela deficiência de MCAD.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, D.R. et al. Evidence that antioxidants prevent the inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex *in vitro*. **Neurochem Res.** v.28, p.1255-1263, 2003.

ASSIS, D.R. et al. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. **Brain Res.** v.1030, p.141-151, 2004

ASSIS, D. R. **Efeitos *in vitro* de metabólitos acumulados na deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) sobre parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens**, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006, p. 75.

BERRY, M.N. et al. The calorogenic nature of hepatic ketogenesis: an explanation for the stimulation of respiration induced by fatty acid substrates. **Eur J Biochem.** v.131, p.205-214, 1983.

GREGERSEN, N. et al. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. **J Inherit Metab Dis.** v.31, p.643-657, 2008.

GHISLA, S. Beta-oxidation of fatty acids. A century of discovery. **Eur J Biochem.** v.271, p. 459-461, 2004.

ERNA, R.B.; CORNEJO, V.E. Defectos de la oxidación de ácidos grasos como causa de hipoglucemia no cetósica em el niño. **Revista Chil Nutr.** v.34, n. 1, 2007.

KIM, C. S. et al. L-carnitine: therapeutic strategy for metabolic encephalopathy. **Brain Res.** v.310, p.149-153, 1984

KIM, C. S. et al. LI-Carnitine prevents mitochondrial damage induced by octanoic acid in the rat choroid plexus. **Brain Res.** v.536, p.335–338, 1990.

KOMPARE, M.; RIZZO, W. B. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. **Seminars in Pediatric Neurology.** v.15, p.140-14, 2008.

OLSON, J.E. et al. Octanoic acid inhibits astrocyte volume control: implications for cerebral edema in Reye's syndrome. **J Neurochem.** v.52, p. 1197-1202, 1989.

ONKENHOUT, W et al. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. **Clin Chem.** v. 41, p. 1467–1474, 1995.

ROE, C. R.; DING, J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. **New York: McGraw-Hill.** p.1909-1963, 2001.

SCHOLZ, R. et al. Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO<sub>2</sub> production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. **Eur J Biochem.** v.15, p.223- 230, 1984.

SCHUCK, P.F. et al. Oxidative stress induction by *cis*-4decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. **Free Radical Research.** v.41, p. 1261-1272, 2007.

SCHUCK, P.F. et al. Evidence that the major metabolites accumulating in MCAD deficiency disturb mitochondrial homeostasis in rat brain. **Brain Research.** v.1296, p. 28, 2009.

SMITH, C.M. et al. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. **Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.** 2<sup>a</sup> ed, 2005.