



**FMUC** FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM  
MEDICINA**

**Jaquelina Henriques da Silva**

**DEFICIÊNCIA DAS ENZIMAS DO CICLO DE KREBS**

**ARTIGO DE REVISÃO**

**Trabalho realizado sob a orientação de:**

**Professora Doutora:Manuela Grazina**

**Julho/2016**

Copyright © Jaquelina Silva e Manuela Grazina, 2016

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e dos orientadores científicos e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser usada ou publicada sem a referência apropriada após autorização pelo responsável do estudo, a Professora Doutora Manuela Grazina.

**INDICE**

<b>I.</b>	<b>RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>III.</b>	<b>PALAVRAS-CHAVE</b>	<b>9</b>
<b>IV.</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>V.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>VI.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	<b>14</b>
	<b>1. Importância e descrição do Ciclo dos ácidos tricarboxílicos</b>	<b>14</b>
	<b>2. Mecanismos de regulação do ciclo</b>	<b>16</b>
	<b>3. Compartimentalização das enzimas mitocondriais</b>	<b>20</b>
	<b>4. Patologias associadas a deficiência enzimática do ciclo de Krebs</b>	<b>22</b>
	<b>4.1. Patologias associadas a inativação da Fumarato Hidratase e da Succinato Desidrogenase mitocondriais</b>	<b>22</b>
	<b>4.2. Deficiência da FH e a existência de um fenótipo metabólico</b>	<b>29</b>
	<b>4.3. A deficiente atividade da malato desidrogenase mitocondrial</b>	<b>32</b>
	<b>4.4. A deficiência da enzima aconitase isomerase</b>	<b>34</b>
	<b>4.5. A deficiência da enzima <math>\alpha</math>-cetoglutatarato</b>	<b>35</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
	<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>

## I. RESUMO

### **Introdução**

A importância do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs está associada à formação de equivalentes redutores para a produção de energia (ATP) pela fosforilação oxidativa, na mitocôndria. Também tem uma importante ligação com outras vias, fornecendo intermediários importantes para a biossíntese de várias moléculas, tais como ácidos gordos, aminoácidos, ou substratos para outras vias metabólicas, como a neoglicogênese. Este trabalho, em formato de artigo de revisão, pretende mostrar a importância das enzimas do ciclo de Krebs e a sua relação com patologias. É possível observar que a deficiência enzimática pode estar relacionada com o aparecimento ou com o prognóstico de patologias de foro metabólico ou mesmo oncológico.

### **Metodologia**

Para a realização deste artigo de revisão foram analisados, como referência, vários artigos científicos e de revisão.

Como critério de inclusão, foram selecionados os artigos com referência às deficiências das enzimas fumarato hidratase, succinato desidrogenase, a malato desidrogenase, a aconitase isomerase e o complexo enzimático da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase porque estas enzimas quando se encontram deficientes são exemplos importantes na gênese de patologias mencionadas na introdução. A base de dados consultada foi o “ Pubmed “, sem restrição a nível do contexto da temporalidade. Os termos de pesquisa mais frequentemente utilizados foram a designação à deficiência das enzimas assinaladas, às mutações dos genes que as codificam e às designações das patologias associadas a estas deficiências enzimáticas.

## **Objetivos**

O objetivo deste trabalho é elaborar um artigo de revisão sobre os achados bioquímicos e genéticos das patologias do ciclo de Krebs, integrados no contexto clínico respetivo.

## **Resultados**

Este estudo põe em evidência a deficiência das enzimas fumarato hidratase e succinato desidrogenase como predisposição para o aparecimento de duas síndromes tumorais hereditárias, a HLCCR (leiomiomatose e carcinoma das células renais hereditários) e a HPGL (paragangliomas com feocromocitoma hereditários) respetivamente. A deficiência daquelas enzimas causa o aumento de duas moléculas intermediárias do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o fumarato e o succinato, que nestas condições, ativam um mecanismo tumoral. Mais recentemente, foi atribuído o estatuto de oncometabolito, que é um conceito muito recente, ao ácido fumárico ou fumarato.

Para o mecanismo de tumorigénese, além da disfunção metabólica que é de grande importância, é essencial o estudo das mutações nos genes que codificam as enzimas correspondentes (por exemplo para a fumarato hidratase é o gene *FMUI*).

São analisadas também evidências de que os doentes com leucemia mieloblástica que apresentam uma atividade deficiente da malato desidrogenase, têm uma evolução clínica mais favorável.

Também é possível observar que a deficiência da aconitase está associada a ataxia de Friedreich, uma doença neurológica com ataxia cerebelosa progressiva associada a cardiomiopatia. A deficiência da enzima é devido a mutação no gene que codifica a proteína frataxina.

Também é descrito uma situação atípica associada à deficiência enzimática E3 do complexo enzimático da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. Este caso mostra a importância do estudo das mutações que afetam o gene que codifica cada subunidade E1, E2 e E3.

### **Conclusão**

Neste estudo foi focada a importância clínica dos défices enzimáticos de enzimas do ciclo de Krebs; contudo, é necessária mais investigação para uma melhor caracterização das causas e dos mecanismos fisiopatológicos associados às suas deficiências para, assim, possibilitar uma terapêutica cada vez mais eficaz, específica e segura.

## II. ABSTRACT

### **Introduction**

The importance of the tricarboxylic acid cycle, or Krebs cycle is associated with the formation of reducing equivalents for energy production (ATP) by oxidative phosphorylation in mitochondria. It also has an important connection with other pathways, providing important intermediates in the biosynthesis of various molecules such as fatty acids, amino acids, or substrates for other pathways such as gluconeogenesis. This work, in a review article format, aims to show the importance of the enzymes of the Krebs cycle and its relationship with diseases. It can be seen that the enzyme deficiency may be related to the appearance or prognosis of metabolic or oncological disorders.

### **Methodology**

To carry out this review article were analyzed as a reference, several scientific and review articles.

As inclusion criteria, the articles with reference to deficiencies of enzymes fumarate hydratase, succinate dehydrogenase, the malate dehydrogenase, isomerase aconitase and the enzyme complex of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase were selected because these enzymes when they are disabled are important examples in the genesis of diseases mentioned in the introduction. The consulted database was "Pubmed" without restriction within the context of temporality. The search terms used most frequently were the designation of disability marked enzymes, the mutations of the genes that encode them and the names of the diseases associated with these enzyme deficiencies.

## Objectives

The objective of this work is to prepare a review article on the biochemical and genetic findings of the pathologies of the Krebs cycle, integrated in the clinical setting appropriate.

## Results

This study highlights the deficiency of the enzyme fumarate hydratase and succinate dehydrogenase as predisposition to the appearance of two hereditary tumor syndromes, HLCCR (hereditary leiomyomatosis and carcinoma of the renal cell) and HPGL (hereditary paragangliomas with pheochromocytoma) respectively. The deficiency of these enzymes causes an increase of two intermediate molecules of the cycle of tricarboxylic acids, fumarate and succinate, under these conditions, a tumor trigger mechanism. More recently it was awarded the oncometabolito status, which is a very recent concept, the fumaric acid or fumarate.

For the tumorigenesis mechanism, besides the metabolic dysfunction that is of great importance, it is essential the study of mutations in genes that encode the corresponding enzymes (for example fumarate hydratase gene is *FMUI*).

They are also analyzed evidence that patients with myeloid leukemia that have a deficient activity of the malate dehydrogenase, have a more favorable clinical course.

You can also note that aconitase deficiency is associated with Friedreich's ataxia, a neurological disease with progressive cerebellar ataxia associated with cardiomyopathy. The enzyme deficiency is due to a mutation in the gene encoding frataxin protein.

It is also described an atypical situation associated with enzyme deficiency E3 enzyme complex of  $\alpha$  ketoglutarate dehydrogenase. This case illustrates the importance of the study of mutations affecting the gene encoding each subunit E1, E2 and E3.

## **Conclusion**

In this study we focused the clinical importance of the enzymatic deficits Krebs cycle enzymes; however, more research is needed to better characterize the causes and pathophysiological mechanisms associated with their disabilities to thus enable increasingly effective, specific and safe therapy.

### III. PALAVRAS-CHAVE

Ciclo dos ácidos tricarboxílicos; fumarato hidratase; gene *FMUI*; succinato desidrogenase; supressores tumorais; fumarato; metabolito oncogénico; aconitase; ataxia de friedreich;  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase; stresse oxidativo; mutação *DLD*.

## IV. ABREVIATURAS

NAD<sup>+</sup> - Dinucleotídio de Nicotinamida de Adenina

NADH – Forma reduzida do NAD<sup>+</sup>

FAD – Dinucleotídio de Flavina de Adenina

FADH<sub>2</sub> – Forma reduzida do FAD

ATP – Nucleotídio de Adenosina

GTP – Nucleotídio de Guanosina

CRM – Cadeia Respiratória Mitocondrial

HLCCR – Síndrome Hereditária Leiomiomatose e Carcinoma das Células Renais

HPGL – Síndrome Hereditária Paragangliomatose com Feocromocitomas

FH – Fumarato Hidratase

SDH – Succinato Desidrogenase

HIF1 $\alpha$  - Fator de Indução de Hipóxia

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

ROS – Espécie Reativa de Oxigénio

## V. INTRODUÇÃO

O Ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, assim denominado devido à presença dos ácidos tricarboxílicos, como o citrato e isocitrato. A designação Ciclo de Krebs vem do nome do primeiro bioquímico que estudou as reações químicas do ciclo; também se pode designar por ciclo do ácido cítrico porque o citrato foi a primeira substância conhecida a participar no ciclo.

O ciclo localiza-se na mitocôndria onde está intimamente coordenado com o fluxo de elétrons para a cadeia respiratória isto é com o processo fosforilação oxidativa que decorre na cadeia respiratória mitocondrial.

O ciclo inicia-se com a condensação do grupo acetil da acetil coenzima A com os quatro carbonos do oxalacetato para formar o ácido cítrico (ou citrato) uma molécula com seis carbonos. Depois de um rearranjo, o citrato dá origem ao isocitrato, de modo a facilitar a transferência de elétrons para a molécula de  $\text{NAD}^+$  na reação de oxidação do isocitrato. De seguida ocorrem duas descarboxilações oxidativas, onde se formam duas moléculas de  $\text{CO}_2$  e são transferidos os elétrons para o dinucleótido nicotinamida de adenina ( $\text{NAD}^+$ ) para formar  $\text{NADH}$ . Destas duas reações, são formadas, na primeira o  $\alpha$ -cetoglutarato com cinco carbonos e na segunda forma-se, succinil CoA com quatro carbonos. Com a formação de uma molécula de guanina trifosfato que tem uma ligação fosfato de elevada energia, forma-se succinato de quatro carbonos. Nas últimas reações do ciclo, o succinato por oxidação dá origem ao fumarato e a  $\text{FADH}_2$ . O fumarato, após formar malato, por hidratação, é oxidado e dá origem a oxalacetato e a uma molécula de  $\text{NADH}$ . A molécula de oxalacetato é assim regenerada, sendo essencial para o início do ciclo.

Em cada volta do ciclo formam-se três moléculas de  $\text{NADH}$ , uma molécula de  $\text{FADH}_2$  e uma molécula de GTP (equivalente ao ATP). A energia que se forma corresponde a 90% da

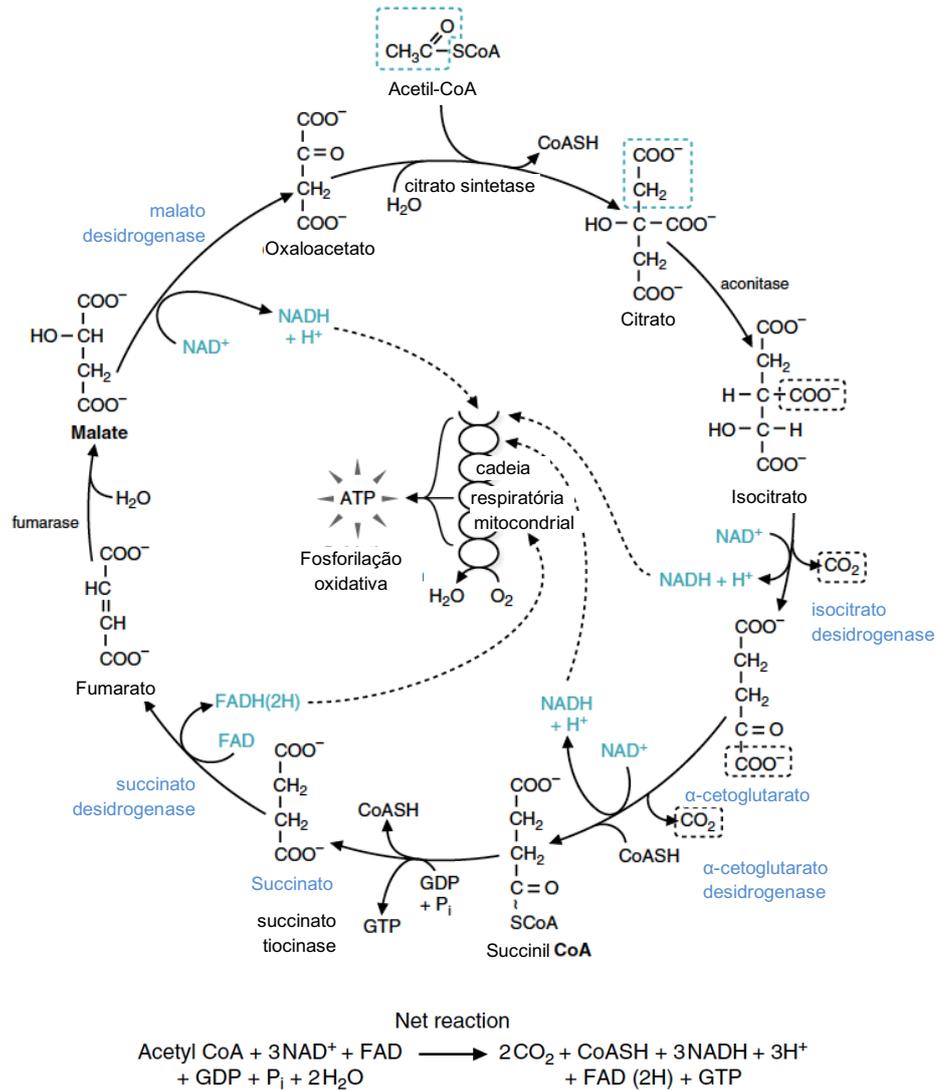
energia presente no grupo acetil da molécula de acetil coenzimaA. Este facto mostra que as reações do ciclo são extremamente eficientes ao transferir energia nas ligações químicas desde do grupo acetil até outras moléculas intermediárias do ciclo, nomeadamente com alto poder redutor para a síntese de ATP.

O grupo acetil da molécula de acetil-CoA transfere os seus oito eletrões e dois carbonos para o ciclo. A ligação entre o grupo acetil e a CoA é de elevada energia. Os dois átomos de carbono do grupo acetil dão origem às duas moléculas de  $\text{CO}_2$  e os, oito electões são transferidos para formar uma molécula de  $\text{FADH}_2$  e três moléculas de NADH.

As reações do ciclo de Krebs estão na figura 1 com início na condensação da molécula de acetil-CoA à molécula de oxaloacetato, uma molécula com quatro carbonos. Da condensação da molécula de acetil-CoA ao oxaloacetato, forma-se o citrato com seis carbonos e liberta-se a CoA que liga se ao grupo SH.

A molécula de acetil-CoA provem da convergência das principais vias oxidativas que produzem energia, como a via glicolítica da glicose ou de outros hidratos de carbono; a  $\beta$  oxidação dos ácidos gordos; a degradação dos corpos cetónicos; a oxidação do piruvato que resulta, da via glicolítica, da conversão do aminoácido alanina ou também da oxidação de muitos aminoácidos por exemplo a leucina e a isoleucina; o acetato que vem da dieta ou da oxidação do etanol pode também formar acetil-CoA.

É também importante realçar que algumas moléculas intermediárias do ciclo são também precursores para diversas vias metabólicas. Estas vias estão presentes em vários tipos de células diferentes, sendo de grande relevância no fígado, por exemplo. O ciclo regula a concentração das moléculas que dele fazem parte, através de vários mecanismos e o mesmo acontece em relação ao fluxo das moléculas intermediárias do ciclo para vias que lhe estão associadas.



**Figura 1** – Reações do ciclo de Krebs (adaptado de Lieberman, 2010).

As enzimas das reações de oxidação-redução e seus cofatores estão a azul.

Os dois carbonos do grupo acetil da acetil-CoA estão numa box azul.

Os carbonos libertados sob a forma de CO<sub>2</sub> estão também numa box.

## VI. DESENVOLVIMENTO

### 1. Importância e descrição do Ciclo de Krebs

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos tem início com a condensação do oxalacetato com a molécula de acetil-CoA, uma reação importante onde o oxalacetato é necessário para a oxidação da molécula de acetil-CoA.

A molécula de acetil-CoA, uma molécula de elevada energia, é um tioéster do ácido acético e a função da CoASH é participar na reação catalisada pela enzima citrato sintetase utilizando a energia libertada da clivagem da ligação tioéster entre o átomo de enxofre da CoASH e o grupo acetil. Esta ligação de elevada energia vai ativar o carbono  $\alpha$  do grupo metil. O carbono ativado é importante para a condensação com o oxalacetato.

O grupo acetil vai dar origem a duas moléculas de  $\text{CO}_2$ , com transferência de oito elétrões. A principal função do ciclo é conservar a energia que vem da oxidação da molécula do grupo acetil (ver figura 2). Os oito elétrões cedidos pelo grupo acetil da molécula de acetil-CoA surgem em três moléculas de NADH e uma de  $\text{FADH}_2$  através da transferência de elétrões das moléculas intermediárias do ciclo para o  $\text{NAD}^+$  e para o FAD, que são coenzimas do ciclo.

O ciclo tem como início a condensação entre o grupo acetil e o oxalacetato com libertação da CoA e a formação da molécula de citrato, uma molécula intermediária com seis carbonos (um ácido tricarboxílico), que vai progredir no ciclo até dar origem de novo ao oxalacetato (um ceto ácido com dois grupos carboxilo). Nesta progressão verifica-se a necessidade de quatro desidrogenases: do isocitrato, do  $\alpha$ -cetogluturato, do succinato e do malato, enzimas necessárias para dar origem a três moléculas de NADH e uma molécula de  $\text{FADH}_2$ .

A enzima isocitrato desidrogenase catalisa a oxidação do grupo hidroxilo da molécula isocitrato (ácido tricarboxílico) com a formação de uma molécula de NADH. A enzima também catalisa a subsequente clivagem do grupo carboxilo que dá origem a uma molécula de CO<sub>2</sub>, ocorrendo uma oxidação seguida de uma descarboxilação, resultando como produto uma molécula,  $\alpha$ -cetogluturato (um cetoácido com dois grupos carboxilo).

Em seguida, o complexo enzimático da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase catalisa uma reação de descarboxilação oxidativa formando succinil-CoA (que é um cetoácido com um grupo carboxílico). A molécula tem uma ligação à CoASH de forma semelhante que na acetil-CoA, através de uma ligação tioéster. Nesta reação, um dos grupos carboxilo da molécula de  $\alpha$ -cetogluturato dá origem ao CO<sub>2</sub> e o grupo adjacente é oxidado, dando origem a uma molécula de NADH, resultando a molécula intermediária succinil-CoA.

A reação catalisada pela enzima succinato tiocinase também é importante; a energia da ligação tioéster da molécula succinil-CoA (um ceto ácido com um grupo carboxilo, na qual o carbono do grupo cetónico se liga à CoA através de uma ligação tioéster). Esta reação catalisada pela enzima succinato tiocinase leva à formação de succinato (um ácido dicarboxílico) e à libertação da CoA (CoASH) com formação de uma molécula de guanosina trifosfato. Esta reação não é uma fosforilação oxidativa, é um exemplo de uma fosforilação à custa do substrato com a formação de uma ligação fosfato de elevada energia, sem necessidade de O<sub>2</sub>, uma fosforilação a partir da energia da clivagem da ligação tioéster da succinil- CoA.

Na reação seguinte, o succinato dá origem ao malato e a enzima que catalisa esta reação é a succinato desidrogenase onde dois eletrões são transferidos da molécula de succinato para a coenzima FAD dando origem a uma molécula FADH<sub>2</sub>. Para esta reação é necessário o hidroxilo e o H<sup>+</sup> que intervêm na formação da ligação dupla do fumarato.

Também são importantes as reações catalisadas pela aconitase e pela fumarato hidratase. A primeira enzima catalisa o rearranjo dos eletrões na molécula de citrato, formando

isocitrato e facilitando a transferência dos elétrons para a coenzima  $\text{NAD}^+$ . A fumarato hidratase catalisa a reação na qual o fumarato dá origem ao malato.

A enzima malato desidrogenase catalisa a última reação do ciclo, resultando em oxalacetato (que é um cetoácido) e  $\text{NADH}$ .

As enzimas do ciclo e suas funções estão representadas na figura 1. A figura também mostra a importância do grupo acetil da molécula acetil-CoA ao dar origem a duas moléculas de  $\text{CO}_2$  e ao realizar a principal função do ciclo que é conservar a energia que vem da oxidação da molécula do grupo acetil. Assim, os oito elétrons cedidos pelo grupo acetil da molécula de acetil-CoA dão origem a três moléculas de  $\text{NADH}$  e uma de  $\text{FADH}_2$ .

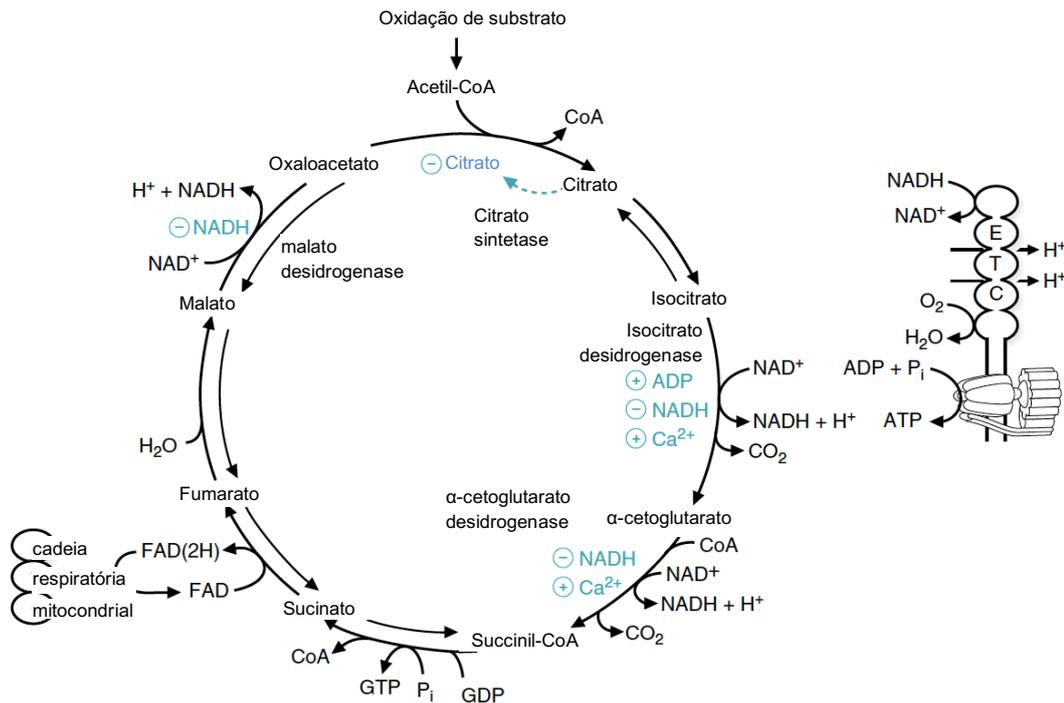
A oxidação da acetil-CoA durante o ciclo e o armazenamento de parte desta energia nas moléculas de  $\text{NADH}$  e de  $\text{FADH}_2$ , é essencial para a produção de ATP em praticamente todas as células do organismo. Independentemente do substrato oxidado para a formação da molécula de acetil-CoA, as células mantêm constantes os níveis de ATP, em condições normais.

## 2. Mecanismos de regulação do ciclo

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos, tal como todas as outras vias de oxidação tem uma regulação intimamente relacionada com a velocidade do fluxo dos elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. Este fluxo de elétrons depende da velocidade de utilização do ATP, e do quociente  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Dentro da célula e dentro da mitocôndria a concentração total de nucleótidos de adenina ( $\text{AMP}$ ,  $\text{ADP}$  e  $\text{ATP}$ ) e o total de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  mantêm-se relativamente constantes.

O ciclo também é regulado por várias enzimas, as mais importantes para a regulação são as que catalisam as reações com  $\Delta G < 0$ : a citrato sintetase, a isocitrato desidrogenase e o complexo enzimático da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase. A figura 2 mostra que a enzima citrato

sintetase é regulada principalmente pela concentração disponível do oxalacetato e por feedback negativo pelo citrato. A isocitrato desidrogenase é inibida por NADH e ativada por ADP e  $\text{Ca}^{2+}$ . O complexo enzimático  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, muito semelhante ao complexo enzimático piruvato desidrogenase, necessita dos mesmos cofatores e é ativado por  $\text{Ca}^{2+}$  e inibido por NADH e succinil-CoA (figura 2).



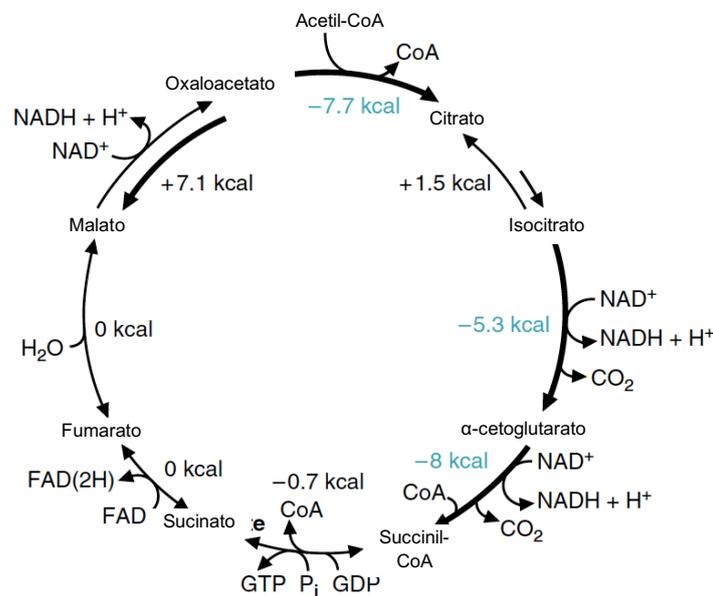
**Figura 2** – Principais moléculas reguladoras das enzimas das reações irreversíveis do ciclo de Krebs (adaptado de Lieberman, 2010).

A velocidade de hidrólise do ATP controla a velocidade de síntese da ATP, esta por sua vez controla a velocidade de oxidação de NADH na CRM. Todo o NADH e  $\text{FADH}_2$  produzido no ciclo cede os seus elétrons para a CRM. Assim a concentração do ADP e do NADH dão informações ao ciclo de Krebs, acerca da velocidade fosforilação oxidativa da CRM.

As enzimas isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato e malato desidrogenases são inibidas pelo aumento da concentração de NADH. O rácio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  muda a concentração de oxalacetato. O ADP é um ativador alostérico da isocitrato desidrogenase.

Estas três reações têm elevado  $\Delta G$ , o que favorece o sentido oxidativo da reação, isto é, a progressão do ciclo. Estas reações são irreversíveis essencialmente porque os produtos não têm, em condições fisiológicas, uma concentração suficientemente elevada para permitir ultrapassar o elevado valor negativo de  $\Delta G$  (figura 3).

Relativamente à regulação do ciclo tal como é observado para as vias metabólicas que são reguladas por feedback, a primeira reação da via deve ser regulada de modo a que os precursores possam fluir para vias alternativas quando não estão a ser necessários.



**Figura 3** – Valor do  $\Delta G^0$  de cada reação do Ciclo de Krebs (adaptado de Lieberman, 2010). As reações com  $\Delta G$  bastante negativo estão a azul.

Assim, a enzima que catalisa esta reação é a citrato sintetase, que não tem reguladores alostéricos e a velocidade da reação é controlada principalmente pela concentração de oxalacetato e pelo citrato, que é um produto com ação de feedback negativo, competindo com o oxalacetato. Como a constante de equilíbrio da reação malato – oxalacetato, favorece a acumulação de malato; logo, a concentração de oxalacetato é muito baixa dentro da mitocôndria

e é mais baixa do que a  $K_m$  da citrato sintetase. Quando o rácio  $NADH/NAD^+$  aumenta, a concentração de malato aumenta e a de oxalacetato diminui. Pelo contrário, quando a enzima isocitrato desidrogenase é ativada, a concentração de citrato diminui, deixando de inibir a citrato sintetase; logo, a concentração de oxalacetato aumenta e a de citrato diminui, respondendo ao aumento da necessidade energética da parte do organismo. No fígado, o rácio  $NADH/NAD^+$  é importante para determinar se o acetil-CoA entra no ciclo ou segue para vias alternativas, como por exemplo, para a síntese de corpos cetónicos.

Ao contrário das reações irreversíveis, as reações reversíveis catalisadas pela acotinase e pela malato desidrogenase têm um  $\Delta G > 0$ . A acotinase atua com maior velocidade em ambas as reações, mantendo o equilíbrio no rácio das concentrações de produtos e substratos, sendo a concentração de citrato vinte vezes superior à do isocitrato (Lieberman, 2013).

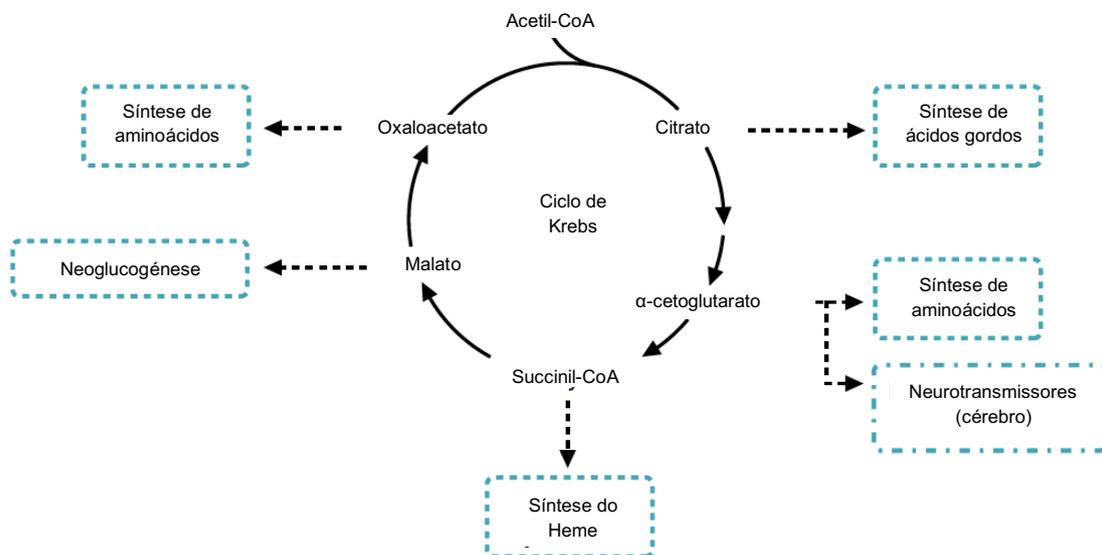
Assim, a acumulação de citrato em vez de isocitrato, permite o transporte de citrato para o citosol, onde é usado para a formação de acetil-CoA, necessário para entrar em vias metabólicas, tais como a síntese de ácidos gordos ou de colesterol. Mas também é importante na regulação do ciclo de Krebs, inibindo a citrato sintetase quando as necessidades energéticas são menores.

Da mesma forma, a constante de equilíbrio da reação catalisada pela malato desidrogenase favorece a acumulação de malato, relativamente ao oxalacetato, resultando numa diminuição da concentração de oxalacetato, que é influenciada pelo rácio  $NADH/NAD^+$ . Assim, existe um fluxo no sentido da conversão de oxalacetato em malato, que é importante no fígado durante o jejum (devido à oxidação dos ácidos gordos, que aumentam o rácio  $NADH/NAD^+$ ) e o malato pode então ser transportado para fora da mitocôndria e ser o substrato para a neoglicogénese.

Fundamentalmente, a regulação do ciclo tem duas funções, assegurar que as necessidades de  $NADH$  sejam repostas rápidas para manter a homeostasia de ATP; a segunda

função é regular a concentração das moléculas que constituem o ciclo. Existem vários mecanismos que regulam a concentração das moléculas intermediárias do ciclo e o seu fluxo, em vias metabólicas que estão interligadas (Figura 4).

As moléculas intermediárias do ciclo podem ser usadas para a síntese de biomoléculas, que são necessárias em células ou tecidos específicos. O oxalacetato e o malato podem entrar na neoglicogénese, no fígado e no rim. O  $\alpha$ -cetogluturato pode ser usado para a síntese de aminoácidos e de neurotransmissores.

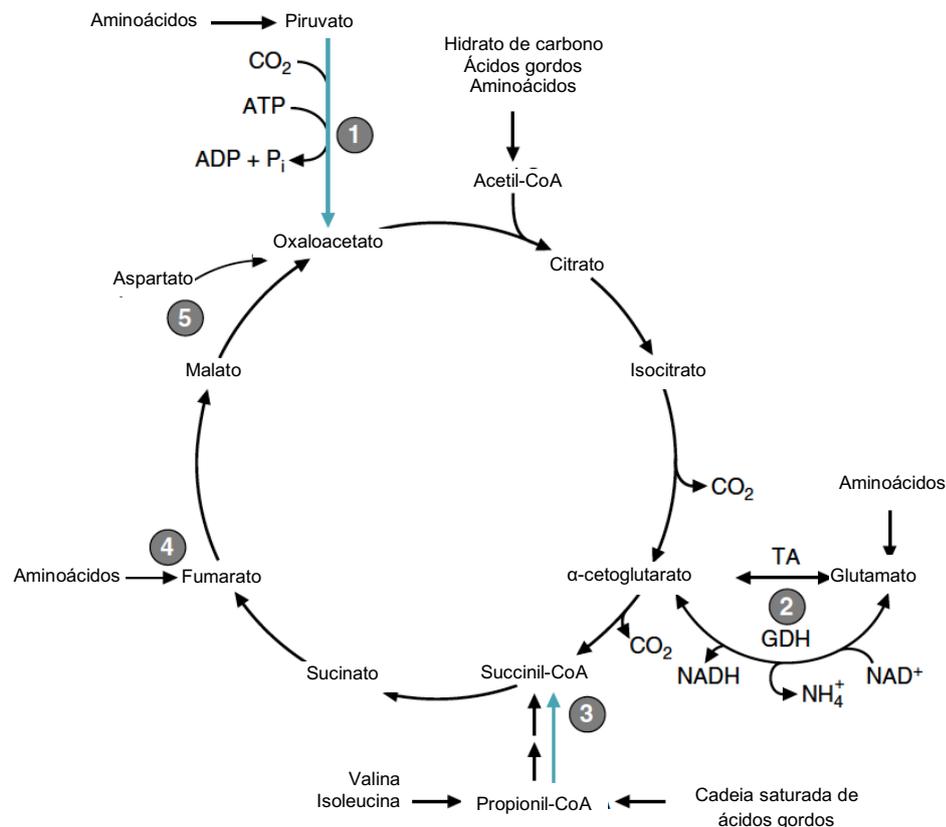


**Figura 4** – Utilização dos intermediários do Ciclo de Krebs para outras vias metabólicas (Lieberman, 2013).

Por exemplo no fígado, alguns intermediários estão continuamente a serem utilizados para as vias de síntese de ácidos gordos, para a da síntese de aminoácidos, para a neoglucogénese e para a síntese do heme.

Devido à saída das moléculas intermediárias e à necessidade do oxalacetato como dador de quatro carbonos a partir da sua cadeia hidrocarbonada. O oxalacetato tem a função de se condensar com a molécula de acetil-CoA, de modo a facilitar a oxidação do grupo acetil.

Para reposição das moléculas intermediárias do ciclo de Krebs, existem vários mecanismos (representados na figura 5), sendo as vias metabólicas 1 e 3 são as mais importantes.



**Figura 5** – Principais vias para reposição dos intermediários do Ciclo (Lieberman, 2013)

As vias 1 e 3 são as principais. A via 1 corresponde à piruvato carboxilase. A via 2 presente em muitos tecidos, o glutamato é convertido de forma reversível a  $\alpha$ -cetoglutarato. Na via 3 a valina e a isoleucina que resultam da oxidação de cadeia curta de ácidos gordos também entram no ciclo pela succinil-CoA. Na via 4 e 5 outros aminoácidos dão origem ao fumarato e ao oxaloacetato, respetivamente.

### 3. Compartimentalização das enzimas mitocondriais

As mitocôndrias constituem um compartimento funcional com capacidade reguladora. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a aniões e catiões, e as moléculas só podem atravessar a membrana através de proteínas de transporte específicas. Assim, as enzimas do

ciclo dos ácidos tricarboxílicos, têm maior acesso direto aos produtos das reações anteriores da via, do que teriam se esses produtos pudessem difundir-se pela membrana.

Além disso, a formação de complexos entre enzimas também impede o acesso das moléculas intermediárias a outras vias metabólicas, embora a enzima malato desidrogenase e a citrato sintetase tenham uma fraca associação com complexos.

A compartimentação é muito importante na regulação do ciclo. A ligação restrita e coordenada entre a velocidade da cadeia transportadora de elétrons e a velocidade do ciclo de Krebs é mantida devido pool de NADH e  $\text{NAD}^+$  na matriz mitocondrial. As moléculas  $\text{NAD}^+$ , NADH, CoASH, e os derivados de acetil-CoA, intermediários do ciclo de Krebs, não têm proteínas de transporte e não podem atravessar a membrana mitocondrial. Assim, todas as desidrogenases competem pelas mesmas moléculas de  $\text{NAD}^+$  e são inibidas quando a concentração de NADH aumenta.

## **4. Patologias associadas a deficiências enzimáticas do ciclo de Krebs**

### **4.1 Patologias associadas a deficiência da Fumarato Hidratase e da Succinato Desidrogenase mitocondriais**

Estudos realizados anteriormente demonstraram que os genes que codificam a fumarato hidratase e a succinato desidrogenase mitocondriais atuam como supressores tumorais. Assim, mutações nos genes da fumarato hidratase predisõem para o aparecimento de leiomiomas e tumores renais, enquanto mutações nos genes que codificam a subunidade B, C e D da succinato desidrogenase causam paragangliomas e feocromocitoma. Estas duas síndromes são hereditárias, autossômicas dominantes, com elevada penetrância.

As mutações do gene que codifica a subunidade D da succinato desidrogenase estão associadas com paragangliomas e feocromocitomas múltiplos mas benignos, enquanto mutações no gene que codifica a subunidade B estão na origem de uma maior proporção de lesões malignas. As mutações que afetam a subunidade C são pouco comuns. A maioria das lesões da síndrome HLRCC são benignas e são tumores do músculo liso do útero e da pele.

A fumarato hidratase (FH) catalisa a hidratação de fumarato com formação de malato e a succinato desidrogenase (SDH) que é constituída por quatro subunidades (A, B, C, D) que estão codificadas em genes diferentes, catalisa a desidrogenação oxidativa do succinato e faz parte do complexo II succinato-ubiquinona oxidoreductase da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) associado à redução da ubiquinona.

Foram apresentados vários mecanismos para explicar como é que uma produção deficiente de energia pode conduzir à tumorigénese. Entre as várias hipóteses, uma refere-se a inativação das vias de hipoxia (a via pseudo-hipóxia); outra refere-se ao stresse oxidativo, com um aumento das espécies reativas de oxigénio (ROS), levando a uma resposta de stresse e/ou lesões genéticas; outra hipótese está relacionada com a alteração dos mecanismos apoptóticos, resultantes de uma disfunção mitocondrial e de um mecanismo ainda mal definido, associado ao anabolismo dos intermediários glicolíticos.

A hipótese de que a sinalização da via pseudo-hipóxia causa tumorigénese, nomeadamente tumores HLRCC e HPGL são favorecidos comparativamente com a síndrome Hippel-Lindau. As mutações que causam esta síndrome, também influenciam a estabilidade do fator indutor de hipoxia (HIF), que ativa a transcrição de genes que codificam proteínas pró-angiogénese, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Quando não existe hipoxia, o HIF1 $\alpha$  está normalmente hidroxilado a nível de determinados resíduos de prolina, sendo alvo da degradação por parte do complexo da E3-ubiquitina ligase.

Recentemente, há estudos que mostram evidências da existência de um mecanismo comum para a tumorigênese nas duas síndromes hereditárias HPGL e HLRCC, relacionadas com a expressão de genes para resposta à hipoxia (Pollard et al., 2005). Assim, a análise de quatro tumores (três paragangliomas e um extra adrenal feocromocitoma) causados por mutações da subunidade D da enzima succinato desidrogenase mostra níveis elevados do fator VEGF e da proteína HIF1 $\alpha$ . Este último fator é geralmente considerado o mediador central da resposta à hipoxia e verifica-se que os níveis deste fator estavam moderados em cada um dos quatro tumores enquanto que, nas lesões esporádicas e nos tecidos sem lesões, esta concentração é indeterminada, por ser muito baixa. Do mesmo modo, em doentes com mutações no gene que codifica a enzima FH, os leiomiomas mostram um aumento na densidade microvascular, uma expressão aumentada do fator VEGF e subexpressão do inibidor da angiogênese (TSP1), em comparação com o miométrio normal.

Estudos mais recentes descritos no artigo (Pollard et al., 2005) reforçam o que foi dito no parágrafo anterior e ao utilizar um sistema *in vitro* para causar disfunção do ciclo de Krebs, verifica-se que leva à estabilidade do fator HIF. Também em estudos realizados *in vivo*, se verifica que a deficiência da enzima SDH (subunidade D) conduz à acumulação do succinato e à inibição da atividade da enzima HIF-prolil hidroxilase, sem acumulação de radicais livres.

No estudo de (Pollard et al., 2005), foi feito a análise dos efeitos das mutações nos dois alelos da enzima FH ao nível do aumento do fumarato e do succinato nos fibroblastos derivados da pele de doentes com deficiência da enzima relativamente a um grupo controlo, com doentes sem a patologia nem mutações nos alelos da enzima FH; verifica-se que as células com deficiência da enzima apresentam aumento do succinato, relativamente aos fibroblastos do grupo controlo, o método utilizado não era sensível o suficiente para detetar o fumarato. A seguir foi testado o aumento do succinato e do fumarato em doentes com a síndrome hereditária HLRCC e que tenham tumores benignos, relativamente às células de miométrio normal. Os resultados

mostraram que, nas células que têm o tumor benigno, ocorre um aumento elevado do succinato e do fumarato, relativamente ao grupo controlo e que o miométrio nas duas condições referidas apresentava valores semelhantes para cada um dos metabolitos. Assim, o estudo sugere que mutações nos dois alelos do gene FH nas células do tumor em doentes com HLRCC causam aumento do fumarato e, conseqüentemente do succinato.

Outro aspeto analisado permitiu concluir que as células com deficiência da FH não mostravam aumento significativo de stresse oxidativo e a atividade enzimática dos complexos enzimáticos da CRM era mantida.

Outro resultado importante tem a ver com o aumento da expressão do fator HIF1 $\alpha$  no núcleo de HLRCC. No grupo com tumores uterinos benignos, o aumento é moderado e baixo ou moderado nas células circundantes ao tumor, enquanto o aumento é muito elevado nas células com carcinoma renal e moderado nas células circundantes ao tumor.

Outros estudos identificaram mutações no gene que codifica a subunidade B da enzima succinato desidrogenase (SDHB) em seis doentes com paraganglioma.

Os resultados mostraram que as mutações nos dois alelos no gene que codifica a SDHB ou a perda dos alelos no gene que codifica, causam principalmente aumento do succinato. Verifica o aumento do fumarato nos tumores benignos ou malignos, na síndrome HLRCC, com aumento da expressão do fator HIF1 $\alpha$ , que é a molécula central na sinalização da via de hipoxia como também, nos tumores que são causados por mutações nos genes que codificam a subunidade B e D da enzima SDH, onde se observa que o aumento do succinato leva ao aumento da expressão do fator HIF1 $\alpha$ , levando à expressão aumentada dos genes alvo do fator HIF, nomeadamente relacionados com a angiogénese.

Os resultados de um estudo realizado *in vivo* demonstraram que o aumento do fumarato e do succinato, nas células com deficiência da FH, ou da SDH, nas células tumorais causam a estabilização do fator HIF1 $\alpha$  (Pollard et al., 2005). O principal objetivo deste estudo foi

esclarecer o mecanismo de sinalização da via pseudo-hipóxia na etiopagenia dos tumores HLRCC e HPGL. Este estudo evidenciou ainda que uma expressão excessiva do fator HIF1 $\alpha$  é uma resposta patológica, por dois motivos: não se observa nenhuma associação no leiomioma, no tumor renal, no paraganglioma ou no feocromocitoma, entre a densidade vascular causada pela expressão de CD34 e à que é devido à expressão do fator HIF1 $\alpha$ , o que reforça a evidência de que a expressão do fator HIF1 $\alpha$  não é só devido à diminuição da vascularização, seguida de hipoxia, mas a outro mecanismo. Em segundo lugar, são encontrados valores mais elevados de HIF1 $\alpha$  nos tumores HLRCC do que no miométrio que o rodeia e os níveis de expressão dos alvos do fator HIF1 $\alpha$ , tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o TSP1 e o BNIP1, estão aumentados na síndrome tumoral HLRCC, relativamente aos leiomiomas esporádicos. Como a densidade microvascular é maior nos leiomiomas da síndrome HLRCC, se a expressão de HIF1 $\alpha$  fosse secundária à hipoxia, seriam de esperar níveis baixos da sua expressão e da dos seus genes alvo nos tumores HLRCC mais vascularizados.

Embora Selak et al (Pollard et al., 2005) tenham mostrado anteriormente num estudo *in vitro* que no mecanismo de tumorigênese o aumento de succinato leva a um aumento da expressão do fator HIF1 $\alpha$ , através da inibição das enzimas HIF proлил-hidroxilases (HPH) pelo succinato. A passagem deste ácido dicarboxílico pela membrana interna da mitocôndria e pelos canais de aniões dependentes da voltagem na membrana externa, ocorre através de um movimento livre da mitocôndria para o citosol, onde se encontram as enzimas hidroxilases.

Os resultados do estudo de (Pollard et al, 2005) mostram que *in vivo*, o succinato se acumula nos tumores HPGL e HLRCC e que pode evitar a hidroxilação do fator HIF1 $\alpha$ . Outros mecanismos foram propostos para explicar a sinalização da via pseudo hipoxia, por exemplo o aumento da necessidade de O<sub>2</sub> para a célula devido à ausência de atividade do ciclo de krebs.

Independentemente do mecanismo correto que dá origem à via pseudo-hipóxia nem o estudo de Selak et al., nem o estudo de Pollard et al. evidenciam uma via alternativa para a

tumorogénese nos tumores HLRCC ou HPGL, por exemplo baseado no aumento da concentração de ROS, isto é no stresse oxidativo.

O estudo realizado por Pollard et al. em 2005, refere que o mecanismo da tumorogénese nos tumores HPGL e HLRCC deve ser muito provavelmente a via pseudo-hipoxia tal como na síndrome Von Hippel-Lindau e que a sinalização para esta via resulta da estabilidade do fator HIF, que, por sua vez, é conseguido pelo aumento do fumarato e do succinato. Os tumores em todas estas síndromes têm aspetos morfológicos semelhantes, tais como: elevada densidade vascular e aspetos moleculares como o aumento da expressão do fator HIF1 $\alpha$  e a acumulação de succinato nos tumores HLRCC e HPGL. O estudo também refere a inibição das enzimas hidroxilases (PHDs) pelo fumarato nos tumores HLRCC.

Existem outras moléculas que podem estabilizar o fator HIF, por exemplo o piruvato e o oxaloacetato (Pollard et al, 2005).

Nas células eucarióticas mais desenvolvidas, a enzima FH é uma das enzimas do ciclo de Krebs, na matriz mitocondrial, com uma isoenzima no citosol.

Ao relembrar o que foi descrito sobre o estudo de Pollard (2005), sabe-se que a função da enzima FH mitocondrial está associada à suscetibilidade para HLRCC. Esta síndrome é caracterizada por leiomiomas benignos cutâneos e uterinos, carcinoma das células renais e leiomiosarcoma uterino.

Conforme evidenciado no estudo anterior realizado *in vivo* (Pollard, 2005), a mutação nos dois alelos causa a inativação da FH por deficiência da enzima e esta mutação bi-alélica foi encontrada em quase todos os tumores na síndrome HLRCC. Esta observação levou a sugerir que a enzima FH atua como supressor tumoral. Em estudos mais recentes (Pollard et al, 2005) foi evidenciado que a deficiência da enzima FH leva ao aumento intracelular do fumarato, e este atuaria como inibidor competitivo das enzimas HIF proil hidroxilases (HPHs). A inibição destas enzimas estabiliza o fator HIF prevenindo a sua degradação proteossomal.

O fator de transcrição HIF aumenta a expressão dos genes reguladores da angiogênese, aumentando a expressão de vários fatores, entre os quais o VEGF, aumentando a densidade microvascular e dando origem à tumorigênese, mas este mecanismo não explica totalmente a necessidade de uma concentração tão elevada da isoenzima FH citosólica.

Os estudos realizados por Yogev, em 2010, referem que um único gene *FMUI* codifica a enzima fumarato hidratase e a sua isoenzima, mas o mecanismo da sua distribuição pela mitocôndria e pelo citosol permanece desconhecido.

O principal objetivo deste estudo foi mostrar a função da isoenzima FH citosólica. Esta proteína atua como resposta ao dano nuclear, sobretudo na dupla cadeia de DNA. Para realizar a sua função, a enzima movimenta-se do citosol para o núcleo onde catalisa a reação de interconversão entre o malato e o fumarato. Esta molécula atua na deteção, regulação e/ou na estabilidade de todo o mecanismo de reparação em resposta ao dano do DNA. A FH citosólica, não sendo uma enzima de reparação do DNA, tem um papel importante na deteção ou sinalização de danos a nível do DNA (Yogev, 2010).

Ao analisar progressivamente o estudo de Yogev (2010) é primeiro evidenciado que, para além da função da FH mitocondrial como supressor tumoral, a isoenzima citosólica é importante na reparação de clivagens a nível do DNA, sobretudo de dupla cadeia. Esta afirmação é apoiada por vários fatores, entre os quais a ausência desta enzima estar parcialmente relacionada com a sensibilidade do DNA a clivagens, o que, no estudo referido anteriormente, foi observado em amostras *in vivo* sem a presença da isoenzima no citosol, quando foram analisando as vias de reparação do DNA.

Foi também observado por (Yogev, 2010) que a função da FH depende assim da sua atividade enzimática e a sua ausência nas células pode ser compensada por elevadas concentrações de ácido fumárico (fumarato).

Esta observação é testada através de uma única mutação no gene que codifica a enzima FH, de modo a enzima estar estável mas inativa, não sendo capaz de catalisar a reação de conversão do fumarato em malato. A seguir foi testado a enzima mutante no citosol, para verificar se a sua expressão previne a sensibilidade do DNA a clivagens, o que não se verifica. Este teste indicou que esta função também é importante no citosol. Após testar qual das duas moléculas é necessária para a prevenção de clivagens no DNA, o que é testado colocando amostras com a enzima mutante e com clivagens induzidas no DNA, num meio contendo estas moléculas. Verifica-se que é o fumarato que tem esta função protetora. Este facto sugere uma outra ligação entre a deficiência da enzima FH e a tumorigénese, que é provavelmente independente de HIF. Para realizar a sua função, a enzima desloca-se para o núcleo pela indução de clivagens do DNA.

Como as amostras utilizadas não eram de origem humana, para concluir o estudo faltou testar que, também nas células humanas, as alterações da enzima citosólica aumentavam a sensibilidade do DNA a clivagens.

O estudo de Yogev (2010) sugeriu uma ligação entre a parte metabólica (representada pela presença da enzima FH e do fumarato no núcleo) e a resposta a lesões do DNA nuclear, com a presença de um ambiente metabólico no controlo da propagação do tumor.

## **4.2. Deficiência da Fumarato Hidratase e a existência de um fenótipo metabólico**

Nos dois estudos descritos anteriormente (Pollard, 2005; Yogev, 2010), foi demonstrado que a deficiência da fumarato hidratase leva à acumulação de fumarato, que vai ativar a via pseudo hipoxia conforme o modelo proposto para o mecanismo de tumorigénese da síndrome HLRCC, ao estabilizar o fator HIF e assim contribuir para o processo de oncogénese.

Outro estudo mostrou que a deficiência da FH tem outro efeito adicional direto, a nível do estabelecimento de um meio metabólico, que está relacionado com a existência de um fenótipo metabólico, associado à expressão de determinados genes “metabólicos”, especialmente relacionados com o metabolismo da glucose. Além disso, a deficiência desta enzima também está relacionada com genes que regulam a proliferação celular (Ashrafian, 2010).

Como analisado e evidenciado nas dois estudos anteriores a síndrome tumoral HLRCC é hereditária e está associada ao risco de desenvolver predominantemente leiomiomas benignos cutâneos e uterinos e carcinoma agressivo das células renais papilares e do túbulo coletor (RCC) (Pollard, 2005; Yogev, 2010). Os resultados evidenciaram que a acumulação do fumarato era responsável pela ativação da via pseudo-hipóxia ao estabilizar e aumentar a expressão de HIF, contribuindo para a tumorigênese associada à síndrome HLRCC.

Neste estudo (Ashrafian, 2010) o objetivo foi mostrar uma consequência adicional e direta da deficiência da enzima FH, através do surgimento de um meio com determinadas características metabólicas. Para observar e analisar este aspeto, foi desenvolvido um estudo a partir de fibroblastos embrionários de ratinhos (MEF) com deficiência de uma enzima homóloga da enzima FH e, como previsto, as células MEF apresentaram aumento de expressão do HIF e dos seus genes alvo, devido a esta deficiência da FH. Também foi possível observar a ocorrência de alterações metabólicas que confirmaram a maior dependência da via glicolítica e uma elevada produção de lactato. Foi ainda evidente o aumento da atividade das enzimas da via glicolítica, tais como da isoenzima M2 da piruvato cinase (PKM2) e da isoenzima A da lactato desidrogenase (LDHA).

Conforme observado nos estudos anteriores, a estabilidade e o aumento da expressão do HIF dá origem à ativação de uma via pseudo-hipoxia e ao aumento da expressão dos genes que codificam os alvos desse fator. Estes genes incluem fatores de crescimento e de angiogênese,

contribuindo para a tumorigênese. Também foi verificado que, na síndrome tumoral HLRCC, a estabilidade do fator HIF podia ser devido à produção de radicais livres dependentes de glucose (Ashrafian, 2010).

Assim, verifica-se que para além da ativação de uma resposta pseudo hipoxia observada em estudos anteriores, a diminuição da atividade de FH ativa também um meio que permite e contribui para a tumorigênese.

As modificações metabólicas causadas pela diminuição da FH manifestam-se devido, sobretudo, ao aumento da concentração de fumarato e aspartato, bem como à maior ativação das enzimas da glicólise.

A deficiência da fumarato hidratase na síndrome hereditária HLRCC leva à manifestação progressiva de alterações em determinados genes alvo do fator HIF, que estão relacionados com o metabolismo, especialmente o metabolismo glicolítico, e relacionados com a proliferação celular.

A diminuição da atividade da FH está associada ao fenótipo metabólico do efeito de Warburg, que está relacionado com e contribui para a tumorigênese. É conhecido o facto de o aumento da expressão do fator HIF levar ao aumento da transcrição de genes envolvidos no transporte da glucose (por exemplo GLUT 1), dos genes envolvidos no metabolismo da glucose e na formação de lactato (por exemplo dos genes que codificam as enzimas ENO2 e LDHA), na saída de lactato das células (pelo transportador monocarboxilato 1 (MCT1)) e no desvio de intermediários da glicólise para a fermentação, devido à inibição do complexo da piruvato desidrogenase (PDH).

Em conclusão, as alterações na expressão metabólica de genes que codificam as enzimas PK2, ENO2, PKM2 e LDHA, parece ser suficiente para promover o crescimento e a proliferação celular.

Num estudo de 2011 (Semenza, 2011) foi realçada a importância das mutações e dos oncometabolitos na tumorigênese. Foram identificadas mutações em genes com função metabólica, com particular evidência para os genes das enzimas IDH, SDH e a FH. Consequentemente, o interesse pela hipótese de Warburg foi de novo valorizada, isto é, a associação entre a desregulação metabólica e o processo de tumorigênese foi de novo analisado.

Embora a designação de oncometabolito tenha sido recentemente analisada no estudo realizado por Leonardi et al, (2010), esta designação ficou associada à molécula R- 2-hidroxi-glutarato (R-2HG), que é a forma reduzida da molécula 2-oxi-glutarato (2OG). Aquela molécula foi sintetizada quando, devido a mutações nos genes das enzimas IDH1 e IDH2, estas enzimas perdiam a sua atividade na mitocôndria e no citoplasma, respetivamente, na reação oxidativa do isocitrato para dar origem ao 2-oxi-glutarato e uma molécula de NADP (reação oxidativa reversível com descarboxilação).

A molécula HG atua como inibidor competitivo com oxiglutarato (2OG) na atividade das enzimas 2-oxigenases, que incluem as enzimas prolil hidroxilases, as histonas desmetilases e a família das 5-metilcitosina hidroxilases (Chowdhury et al 2011). Assim, seguindo o exemplo da molécula hidroxi-glutarato, podemos definir oncometabolito como uma molécula que está integrada no metabolismo celular normal mas que, quando se acumula, desregula o metabolismo permitindo a progressão para a formação de tumores através de processos complexos que envolvem inibição, disfunção ou ativação de vias que necessitam de maior investigação para serem compreendidas e clarificadas.

O conceito de oncometabolito é recente e pode oferecer uma via real e inovadora para uma variedade de terapias para os tumores e foram discutidas evidências que classificam o fumarato como oncometabolito, que se acumula quando a enzima FH está deficiente (Semenza, 2011).

### **4.3. A deficiência na atividade da malato desidrogenase mitocondrial**

Nos doentes com Leucemia Mieloblástica que apresentaram monossomiado cromossoma 7, as células polimorfonucleares revelaram deficiência na atividade da malato desidrogenase (MDH) mitocondrial. Nos doentes que não tinham esta alteração comossómica, não se verificou esta deficiência enzimática e a clínica era mais favorável (Muchi, 2009).

A definição da síndrome mielodisplásica já relacionada com uma alteração nas células pluripotentes da medula óssea com características clínicas hematológicas, como anemia refratária e aumento de células mieloblásticas. Esta síndrome pode preceder o aparecimento de leucemia mieloblástica aguda (Muchi, 2009).

Na síndrome mielodisplásica, uma situação rara nas crianças, os estudos citogenéticos mostraram uma elevada incidência associada à monossomia cromossómica, dos cromossoma 7 e 8. A monossomia do cromossoma 7 foi considerada como critério de diagnóstico desta alteração mieloproliferativa, que tem um risco elevado de progressão para a leucemia mieloblástica aguda. Os genes que codificam a malato desidrogenase mitocondrial (MDHm), a uma enzima que dá origem ao oxaloacetato a partir do malato no ciclo de Krebs, estão localizadas no cromossoma 7.

Verificou-se que a transformação tumoral era acompanhada pela alteração da atividade enzimática e da microestrutura mitocondrial (Muchi, 2009).

Os objetivos deste estudo foram a descrição clínica e laboratorial de alguns casos de síndrome mielodisplásica em crianças, para além da determinação da atividade da enzima malato desidrogenase mitocondrial e citoplasmática na síndrome mielodisplásica e noutras patologias hematopoiéticas. Foi também investigado se a deficiência da MDHm era devido ao efeito cumulativo das alterações da monossomia no cromossoma 7. E também foi importante comparar a atividade das duas isoenzimas, MDHm e MDHc na síndrome mielodisplásica e

noutras doenças hematopoiéticas, incluindo a leucemia. Dos três casos estudados com síndrome mielodisplásica em crianças, um foi apresentado com anemia refratária e aumento das células blásticas na medula óssea e no sangue periférico e com deleção no braço longo do cromossoma 7. O segundo caso apresentava anemia refratária desde há um ano, tendo o doente falecido com leucemia mieloblástica aguda; apresentava monossomia do cromossoma 7. O terceiro caso tinha um grande aumento de células mieloblásticas na medula óssea e no sangue periférico mas não tinha nenhuma evidência de alteração cromossômica. Verificou-se que a diminuição da atividade da MDHm nas células polimorfonucleares nos doentes com monossomia do cromossoma 7 era devido a um efeito de acumulação das alterações cromossômicas e não estava relacionado com as alterações hematológicas, como anemia refratária, aumento das células mieloblásticas na medula óssea e no sangue periférico, ou com a progressão para leucemia mieloblástica aguda. Em contraste, foi demonstrado que a atividade da MDHc não foi alterada. Assim, foi mostrado que esta enzima não apresentava nenhum envolvimento quer, com a síndrome mielodisplásica, quer com a monossomia do cromossoma 7. O gene que codifica a enzima MDHc encontra-se codificado no cromossoma 2.

Os resultados também demonstraram que a monossomia do cromossoma 7 ou a deleção do braço longo estavam relacionados com uma disfunção dos granulócitos polimorfonucleares, mas que outros fatores poderão estar envolvidos.

#### **4.4. A deficiência da enzima aconitase**

A ataxia de Friedreich é uma doença neurológica caracterizada pela ataxia cerebelosa progressiva associada a cardiomiopatia. Esta doença neurológica é causada pela alteração do gene que codifica a frataxina, codificado pelo genoma nuclear no cromossoma com consequente diminuição da expressão da proteína.

A função da frataxina é sintetizar agregados de ferro enxofre que vão ser distribuídos nos vários compartimentos celulares. Existe um número elevado de enzimas que contêm estes agregados e têm uma função importante no metabolismo celular. A aconitase é uma dessas enzimas e, na ataxia de Friedreich, esta enzima tem apenas uma atividade residual. Esta atividade pode ser importante para a evolução da doença.

A atividade desta enzima no citosol é importante na regulação do metabolismo do ferro. A perda da atividade desta enzima demonstrou estar relacionada com a morte celular dos cardiomiócitos. Assim, é importante para prevenir a morte celular, nomeadamente das células cardíacas (Gonçalves, 2008).

A frataxina reduz o nível de inativação da aconitase induzida por ROS, sendo uma proteína chaperon, que protege os agregados de ferro enxofre da aconitase e de outras proteínas mitocondriais, da desintegração e promove a reativação enzimática (Hamosh, 2009).

#### **4.5. A deficiência da enzima $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase**

Antes de iniciar a descrição da patologia por deficiência da enzima  $\alpha$ KGDH, é importante analisar o estudo de Aaron Mclain et al, na tentativa de compreender o papel que o multicomplexo enzimático tem como sensor redox mitocondrial, principalmente durante o stresse oxidativo.

Este estudo começou por abordar o ponto de vista tradicional, que refere que uma exposição prolongada e/ ou um aumento da produção de ROS, como ocorre com a idade e/ ou em doenças principalmente neurodegenerativas, leva a um aumento de uma grande variedade de enzimas antioxidantes entre as quais a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione redutase, bem como de moléculas sequestradores de baixo peso molecular, presentes no interior da célula. Quer as enzimas antioxidantes, quer as moléculas

sequestradoras impedem os radicais livres de interagirem com biomoléculas (proteínas, lipídios, DNA e outras), prevenindo os danos oxidativos.

No entanto, devido à falência das intervenções dos antioxidantes tradicionais, que minimizam vários mecanismos funcionais associados à idade e doenças neurodegenerativas, o ponto de vista tradicional pode ser questionado. Além disso, têm surgido evidências de que os radicais livres são compostos importantes em determinadas vias de transdução de sinal e podem, em algumas situações exercerem efeitos benéficos.

A mitocôndria, que é o local onde se produzem a maioria de compostos pro-oxidantes, tem formas de responderão stresse oxidativo para reverter alterações do estado redox. Os resultados mostraram que as células possuem mecanismos para detetar rapidamente e responder ao stresse oxidativo e a fatores moleculares que causam danos provocados pelos radicais livres.

Foram apresentadas evidências de que a enzima mitocondrial  $\alpha$ -KGDHm é um componente do sistema antioxidante da mitocôndria e um importante sensor do estado redox, induzindo alterações importantes no metabolismo celular, para prevenir o dano oxidativo. Esta enzima é singular na sensibilidade ao stresse oxidativo e na capacidade de reverter completamente a inibição mediada pelos radicais livres ou, em determinadas circunstâncias, de reverter a inativação oxidativa (Aaron Mclain, 2011).

A enzima  $\alpha$ -KGDHm representa um dos pontos chave na regulação do ciclo de Krebs, controlando o fornecimento de equivalentes redutores gerados pelo ciclo e assim, o fluxo de elétrons para a cadeia respiratória e conseqüentemente, a produção de ATP. Para além dessa função, tem, como referido anteriormente, uma sensibilidade para radicais livres que repelam a sua atividade enzimática. Esta regulação redox é uma forma de controlar a produção de energia em resposta a alterações do stresse oxidativo na mitocôndria e na célula. Assim, observou-se a diminuição da atividade da enzima em distúrbios neurológicos e cardiovasculares, associados ao stresse oxidativo. Deste modo, a resposta anti-oxidante é complexa e não se limita a remover

radicais livres e produtos pró-oxidantes, mas também envolve alterações na regulação do metabolismo com o objetivo de diminuir a produção de radicais livres e proteger moléculas mitocondriais, do dano oxidativo (Aaron McLain, 2011).

O objetivo deste estudo foi tentar elucidar aspectos estruturais e funcionais da enzima que a tornam singular na resposta ao estado redox mitocondrial. Para esta análise, são apresentados e discutidos os achados chave que avaliam o potencial funcional antioxidante da enzima.

A enzima  $\alpha$ -KGDH é um grande complexo multienzimático composto por três subunidades: E1 que é a enzima  $\alpha$  cetoácido descarboxilase, E2, dihidrolipoamida succiniltransferase e E3, dihidrolipoamida desidrogenase ou dihidrolipoamida  $\text{NAD}^+$  oxireductase.

Com a utilização de cDNAs específicos para cada subunidade, foi encontrada a sequência correspondente a cada uma das subunidades. Os genes correspondentes de cada subunidade foram identificados e estudados. Os genes são para E1 o gene *PDHA1*, para E2 o gene *DLST* e para E3 o gene *DLD*.

Para catalizar os três passos da reação catalizada pela enzima, que leva à formação de succinyl-Co A,  $\text{CO}_2$  e NADH a partir do  $\alpha$  cetoglutarato, são necessários vários cofatores. Os cofatores são a tiamina pirofosfato (TPP) que está fortemente ligada à subunidade E1 por uma ligação covalente; o ácido lipóico ligado à subunidade E2 também por uma ligação covalente; a CoASH, que reage com o grupo succinil do ácido lipoico; o  $\text{FAD}^+$ , que está fortemente ligado à subunidade E3 e o  $\text{NAD}^+$ , que é reduzido pelo  $\text{FADH}_2$  na subunidade E3, dando origem a NADH. É importante referir que a enzima necessita do envolvimento, em cada ciclo, dos estados de oxidação de vários grupos sulfídricos, que rapidamente reagem com moléculas pró-oxidantes e eletrofílicas, resultantes da peroxidação de lípidos que se formam da reação entre radicais livres e lípidos.

Para analisar a regulação reversível da enzima  $\alpha$ -KGDH pelo estado redox, foi usado peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em mitocôndrias isoladas. O  $H_2O_2$  não é um radical, mas é oxidante e pode levar à formação de ROS. Os resultados mostraram que os efeitos do stresse oxidativo na atividade mitocondrial eram reversíveis. Após o tratamento com  $H_2O_2$  verificou-se que o fluxo de eletrões para a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa diminuíram, mas a atividade enzimática recuperava totalmente quando o  $H_2O_2$  não estava presente, o que é indicador de regulação redox (Aaron Mclain,2011).

Posteriormente, foram realizados mais estudos que mostraram que a diminuição do fluxo de eletrões e da fosforilação oxidativa estava associada à inibição reversível das enzimas  $\alpha$ -KGDH e aconitase. A enzima  $\alpha$ -KGDH catalisa a reação limitante do ciclo e, assim controla a produção de NADH. Por sua vez, esta produção regula a velocidade do fluxo de eletrões e a produção de moléculas de ATP. A inibição da enzima é responsável pela diminuição da fosforilação oxidativa induzida pelo  $H_2O_2$ . A inibição enzimática resultou da formação de uma ponte dissulfito entre o grupo sulfídrico da enzima e o glutatião (reação de glutationilação). Esta molécula é importante para a defesa contra os radicais livres, necessitando de duas enzimas que contribuem para esta função, a glutaciona peroxidase e a glutaciona redutase. Depois de gasto o  $H_2O_2$ , a glutaciona é separada pela enzima glutaredoxina ficando a  $\alpha$ -KGDH de novo ativa. A glutationilação da enzima ocorre no cofator, o ácido lipóico (Aaron Mclain et al, 2011).

Depois de analisadas algumas funções da enzima  $\alpha$ -KGDH, a sua deficiência é uma patologia pouco frequente ou até rara, autossômica recessiva, habitualmente característica no período neonatal. Esta patologia caracteriza-se por uma encefalopatia suave e por hiperlactacémia. Geralmente, o prognóstico não é favorável e a criança acaba por falecer nos primeiros anos de vida, sem nenhuma terapia eficiente. Poucos casos foram encontrados em adultos com lesão hepatocelular, sem envolvimento do SNC ou com episódios recorrentes de mioglobínúria. O aumento da concentração dos substratos no sangue periférico e/ou urina

podem ajudar no diagnóstico, que é confirmado através da análise da atividade enzimática e, quando possível, da identificação da mutação genética.

Habitualmente as mutações estão localizadas no gene da enzima da subunidade E1, mas de entre os 11 casos descritos com mutação no gene da subunidade E3, um dos casos tinha uma apresentação atípica, sem aumento do piruvato ou de aminoácidos de cadeia ramificada, no sangue periférico e sem  $\alpha$  cetoácidos de cadeia ramificada na urina. Mas, ao analisar o RNAm através de RT-PCR do gene que codifica E3, seguido da sequenciação, identificou-se a mutação nesta subunidade. Assim três filhos recém-nascidos, filhos de pais consanguíneos, apresentavam hipotonia axial e rigidez dos membros no período neonatal. A TAC-encefálica mostrou atrofia cortical moderada. Um dos recém-nascidos apresentou cardiomiopatia hipertrófica e o agravamento neurológico levou a que os doentes tivessem falecido com 32, 30 e 13 meses respetivamente.

## VII. DISCUSSÃO

Os resultados que foram apresentados neste trabalho, basearam-se nos estudos realizados e descritos em artigos científicos e de revisão. Estes resultados permitiram identificar a importância da função da atividade enzimática de algumas enzimas do ciclo de Krebs. Também permitiram relacionar a deficiência da atividade enzimática com os mecanismos patológicos envolvidos em determinadas doenças.

O trabalho permitiu, por exemplo, verificar que a FH e a SDH atuam como supressores tumorais e a ausência da sua atividade conduz a um mecanismo de tumorigênese e ao aparecimento das síndromes tumorais hereditárias HLRCC e HPGL. Esta observação foi conhecida há alguns anos; mais recentemente, os estudos demonstraram que estes tumores apresentavam um aumento da expressão do fator HIF $\alpha$  e sua ativação. Os estudos realizados mostraram que a acumulação de fumarato ou/ e acumulação de succinato causam a estabilidade do fator HIF $\alpha_1$  e permitiram sugerir que o mecanismo mais provável para explicar a tumorigênese seria através da via da pseudo hipoxia.

Num estudo recente, foi mostrado que a existência da FH citosólica é importante na resposta ao dano do DNA, especialmente de dupla cadeia. A FH é recrutada a partir do citosol para o núcleo por indução do dano oxidativo ao DNA. A FH ou, na ausência da sua atividade, o fumarato, são essenciais na resposta ao dano do DNA. Os resultados mostraram que a FH citosólica desempenha a função de supressor tumoral e, muito provavelmente, é independente do HIF.

Também foi mostrado o envolvimento do metabolismo da célula na resposta às lesões do DNA. Foi ainda demonstrado que existe um controle metabólico para a propagação tumoral.

Foi ainda evidenciado que um efeito direto adicional da deficiência da FH é a formação de um meio biossintético determinado, demonstrando que o aumento da regulação das enzimas

da via glicolítica estava associado à tumorigênese. As células que manifestaram a deficiência de FH proporcionaram um meio metabólico prótumorigênico, logo de início. Este meio glicolítico é reversível, progressivo e esta alteração metabólica dá origem ao crescimento e proliferação celular desregulada.

Foi de grande relevância constatar que, em doentes com Leucemia Mieloblástica com monossomia do cromossoma 7, as células polimorfonucleares revelaram deficiente atividade da MDHm.

Mais estudos foram realizados, entre os quais a análise da atividade deficiente da aconitase, na ataxia de Friedreich e também foi analisado o papel do complexo enzimático da  $\alpha$ -cetoglutarato como sensor redox mitocondrial, principalmente durante o stresse oxidativo e a descrição de um caso atípico por deficiência enzimática da subunidade E3 do complexo enzimático da  $\alpha$ -cetoglutarato.

## VIII. CONCLUSÃO

Neste estudo foi identificado a importância da deficiência na atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs. Embora sejam necessários mais investigações para uma melhor caracterização dos mecanismos fisiopatológicos, a continuidade da investigação nesta área é importante para um melhor conhecimento das funções das enzimas do ciclo de Krebs e para possibilitar uma terapêutica cada vez mais eficaz, específica e segura

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Maria Manuela Grazina, pelo constante apoio, orientação e ajuda para a realização do trabalho.

Agradeço à minha família todo o apoio dado e ao meu sobrinho os momentos muito bons que muito me ajudaram.

Também gostava de agradecer o apoio de pessoas amigas ou conhecidas durante o percurso na faculdade.

## REFERÊNCIAS

**Arredondo, M., Núñez, M. (2005)**, *Iron and copper metabolism*, Molecular Aspects of Medicine, Vol. 26, pág. 313-327.

**Ashrafian, H. e al. (2010)**, *Expression profiling in progressive stages of fumarate-hydratase deficiency: the contribution of metabolic changes to tumorigenesis*, Molecular and Cellular Pathobiology, American Association for Cancer Research, Vol. 70, nº 22, pag. 9153-9165.

**Devlin, T. (2010)**, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, John Wiley and Sons, 7 ed., ISBN: 978-0470281734

**Gonçalves, S. e al. (2008)**, *Deferiprone targets aconitase: implication for Friedreich's ataxia treatment*, BMC Neurology, Vol. 8, nº 20, pág. 1-4.

**Hamosh, A. e al. (2009)**, *Aconitase Mitochondrial, ACO2*, NCBI, Online Mendelian Inheritance in Man.

**Lieberman, M., Marks, A., Peet, A. (2013)**, *Basic medical biochemistry – A clinical approach*, Lippincott, Williams and Wilkins, 4 ed., ISBN: 978-1-45110-003-7.

**Mroch, A., Laudenschlager, M., Flanagan, J. (2011)**, *Detection of a novel FH whole gene deletion in the propositus leading to subsequent prenatal diagnosis in a sibship with fumarase deficiency*, American Journal of Medical Genetics, part A., pág. 155-158.

**Muchi, H., Yamamoto, Y. (2009)**, *Studies on mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenase in childhood myelodysplastic syndrome*, Blood, American Society of Hematology, Vol. 62, nº 4, pág. 808-814.

**Pollard, P. J. e al. (2005)**, *Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 $\alpha$  in tumours which result from germline FH and SDH mutations*, Human Molecular Genetics, Vol. 14, nº 15, pag. 2231-2239.

**Povey, S. e al. (1981)**, *Deficiency of malic enzyme: a possible marker for malignancy in lymphoid cells*, Association of Human Genetics, Vol. 45, pág. 237-252.

**Yogev, O. e al. (2010)**, *Fumarase: A Mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/ nuclear component of the DNA damage response*, Plos Biology, Vol. 8, nº 3, pág. 1-13.