

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

EFEITO *IN VITRO* DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS
ACUMULADOS NA DOENÇA DO XAROPE DO BORDO SOBRE
PARÂMETROS DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM PREPARAÇÕES
MITOCONDRIAIS DE CÉREBRO DE RATOS JOVENS

Alexandre Umpierrez Amaral

ORIENTADOR: Prof. Dr. Moacir Wajner

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010

*Aos meus pais,
Anselmo e Nilza, como sempre.*

*“A morte não é nada; mas viver vencido
e sem glória é morrer todos os dias”*

(Napoleão Bonaparte)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica, representado pelos professores e funcionários, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador e grande colorado, Professor Moacir Wajner, pela orientação e por me transmitir conhecimento, experiência e sabedoria para transpor todos os obstáculos.

Aos professores do grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Ângela, Clóvis e Dutra, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Guilhian, pela amizade e conselhos imprescindíveis para a realização deste trabalho, e por ser, embora gremista, um grande companheiro.

À Bianca, Carol Fernandes e Ângela, pela amizade, conversas, risadas e por me ajudarem na bancada quando sempre precisei.

Ao César, Gustavo e Patrícia, por colaborarem muito para a solução dos problemas que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho e por sempre estarem dispostos a discutir bioquímica e, claro, futebol. Mais gremistas à minha volta.

Aos colegas de laboratório, Alana, Estela, Lisiane, Mateus, Carolina Viegas, Anelise, Fernanda e Luciana, pela amizade, competência e alegria com que cada um trabalha, tornando o nosso dever muito mais gratificante.

Aos que passaram pelo laboratório, Rafael, Alexandre Solano, Anna Laura, Josué, Paula, Giórgia, Lucila, Karina e Ana Paula pela ótima companhia que sempre foram.

À Alexandra, por tudo que me ensinou no período em que trabalhamos juntos.

Aos meus mais antigos amigos, os quais são imprescindíveis para a minha felicidade e existência, por me proporcionarem amizade, diversão e companheirismo.

À Cris, por todo o amor, dedicação, compreensão, companheirismo e amizade, e por tornar meus dias mais felizes.

À família da Cris, pessoas fantásticas que sempre me acolheram e trataram como um dos seus.

À minha família, pela ótima convivência e respeito de sempre, tanto nos bons como nos maus momentos.

Aos meus avós, pelo exemplo de vida que sempre foram para mim.

Aos meus irmãos, pela amizade, dignidade e respeito que sempre tivemos um pelo outro.

Aos meus pais, pelo amor, educação, dedicação e esforços inacreditáveis que me conduziram e conduzirão a todas minhas conquistas, e pelos quais serei eternamente grato.

Obrigado por tudo.

SUMÁRIO

PARTE I.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I.1. INTRODUÇÃO.....	6
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	6
I.1.2. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	6
I.1.3. Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR).....	9
I.1.4. Doença do Xarope do Bordo.....	11
I.1.4.1. Histórico.....	11
I.1.4.2. Etiologia.....	12
I.1.4.3. Diagnóstico da Doença do Xarope do Bordo.....	14
I.1.4.4. Fenótipos clínicos.....	15
I.1.4.4.1. Clássico.....	15
I.1.4.4.2. Intermediário.....	15
I.1.4.4.3. Intermitente.....	16
I.1.4.4.4. Tiamina-responsivo.....	16
I.1.4.4.5. Diidrolipoil desidrogenase (E3)-deficiente.....	17
I.1.4.4.6. Aspectos genéticos.....	17
I.1.4.5. Neuropatologia.....	18
I.1.4.5.1. Achados neuropatológicos.....	18
I.1.4.5.2. Tratamento.....	19

I.1.4.5.3. Fisiopatologia do dano neurológico.....	21
I.1.5. Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial.....	24
I.2. OBJETIVOS.....	30
I.2.1. Objetivo geral.....	30
I.2.2. Objetivos específicos.....	30
PARTE II.....	32
II.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
II.1.1. Animais de experimentação.....	33
II.1.2. Reagentes.....	33
II.1.3. Equipamentos e outros materiais.....	34
II.1.4. Isolamento da Fração Mitocondrial.....	34
II.1.5. Avaliação de Parâmetros Respiratórios.....	35
II.1.6. Determinação da atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico.....	36
II.1.6.1. Determinação da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (α -CGDH).....	36
II.1.6.2. Determinação da atividade da citrato sintase (CS).....	36
II.1.6.3. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase (IDH).....	37
II.1.6.4. Determinação da atividade da succinato desidrogenase (SDH).....	37
II.1.6.5. Determinação da atividade da malato desidrogenase (MDH).....	37
II.1.7. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	38
II.1.8. Medida do conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial.....	38
II.1.9. Inchamento Mitocondrial.....	39
II.1.10. Determinação da Concentração Protéica.....	39

II.1.11. Análise Estatística.....	39
II.2. RESULTADOS.....	40
II.2.1. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	40
II.2.2. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	42
II.2.3. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	44
II.2.4. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	46
II.2.5. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da citrato sintase (CS) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	49
II.2.6. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da isocitrato desidrogenase (IDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	50
II.2.7. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	51
II.2.8. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da malato desidrogenase (MDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	52

II.2.9. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	53
II.2.10. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -hidroxiiisovalérico (HIV) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	55
II.2.11. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	57
II.2.12. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	59
II.2.13. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -hidroxiiisovalérico (HIV) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	61
II.2.14. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	63
II.2.15. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre o inchamento mitocondrial em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	65
PARTE III.....	67
III.1. DISCUSSÃO.....	68
III.2. CONCLUSÕES.....	74
III.3. PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
LISTA DE FIGURAS.....	90

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

A doença do xarope do bordo (DXB) é um distúrbio neurometabólico causada pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos severos, tais como coma e convulsões, bem como edema e atrofia cerebral. Os compostos que se acumulam em maiores concentrações na DXB são o ácido α -cetoisocapróico (CIC), o ácido α -hidroxiiisovalérico (HIV) e a leucina (Leu). Considerando que os mecanismos neurotóxicos na DXB não estão completamente esclarecidos, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito *in vitro* do CIC, HIV e Leu sobre diferentes parâmetros da função em cérebro de ratos jovens, no intuito de verificar alterações que possam esclarecer os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentados pelos pacientes. Foram analisados os parâmetros respiratórios estados 3 e 4, a razão de controle respiratório (RCR) e a razão ADP/O medidos pelo consumo do oxigênio, o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), o conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial, o inchamento mitocondrial, além da atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico α -cetoglutarato desidrogenase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase. Os experimentos realizaram-se na presença de 1 mM e 5 mM de CIC, HIV ou Leu e os substratos respiratórios utilizados foram glutamato/malato (2,5 mM cada), succinato (5 mM) e α -cetoglutarato (5 mM). Observamos que o CIC aumentou o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuiu o RCR com todos os substratos utilizados. Foi também observado que o CIC e a Leu diminuíram o estado 3 da respiração mitocondrial quando foi utilizado α -cetoglutarato como substrato, enquanto que o HIV não modificou nenhum parâmetro respiratório testado. Além disso, o CIC provocou uma redução na razão ADP/O e uma diminuição nos níveis de NAD(P)H mitocondrial utilizando os substratos ligados ao NADH glutamato/malato e α -cetoglutarato. O CIC e a Leu também causaram uma leve redução no $\Delta\Psi_m$ quando α -cetoglutarato foi o substrato. Foi também observada uma inibição da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase provocada pelo CIC, enquanto que o HIV e a Leu não alteraram a atividade de nenhuma das enzimas estudadas. Por último, os metabólitos testados não foram capazes de induzir o inchamento mitocondrial. Nossos resultados indicam que o CIC, seguido da Leu, sendo estes os compostos que mais se acumulam na DXB, atingindo concentrações plasmáticas de 5 mM, prejudicam a homeostase mitocondrial em cérebro de ratos. Caso os presentes resultados possam ser extrapolados para a condição humana, presume-se que a disfunção mitocondrial pode estar envolvida no dano cerebral observado em pacientes portadores da DXB.

ABSTRACT

Maple syrup urine disease (MSUD) is a neurometabolic disorder caused by a deficiency of the mitochondrial enzyme complex branched-chain L-2-keto acid dehydrogenase activity. The affected patients present severe neurological symptoms, such as coma and seizures, as well as edema and cerebral atrophy. The compounds that accumulate in higher concentrations in MSUD are α -ketoisocaproic (KIC), α -hydroxyisovaleric (HIV) e leucine (Leu). Considering that the neurotoxic mechanisms in MSUD are not well established, the purpose of the present study was to investigate the *in vitro* effect of KIC, HIV and Leu on various parameters of the mitochondrial bioenergetics in brain of young rats, in order to verify alterations that could explain the responsible mechanisms by the brain damage found in MSUD patients. It was analysed the respiratory parameters states 3 and 4, the respiratory control ratio (RCR) and the ADP/O ratio measured by oxygen consumption, the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), the mitochondrial matrix content of NAD(P)H, the mitochondrial swelling, besides the citric acid cycle enzymes activity α -ketoglutarate dehydrogenase, citrate synthase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase e succinate dehydrogenase. The experiments were performed in the presence of 1 mM and 5 mM of KIC, HIV and Leu and the respiratory substrates used were glutamate/malate (2,5 mM each), succinate (5 mM) e α -ketoglutarate (5 mM). We observed that KIC increased state 4 respiration and decreased RCR with all the substrates used. It was also observed that KIC and Leu decreased state 3 respiration using α -ketoglutarate as substrate, whereas HIV did not modify any respiratory parameter tested. Furthermore, KIC provoked a reduction in the ADP/O ratio and a decrease in NAD(P)H mitochondrial levels using the NADH-linked substrates glutamate/malate and α -ketoglutarate. KIC and Leu also caused a mild reduction in the $\Delta\Psi_m$ when α -ketoglutarate was the substrate. It was also observed an inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase activity provoked by KIC, whereas HIV and Leu did not alter any enzymatic activities studied. Finally, the metabolites tested were not able to inducing mitochondrial swelling. Our results indicate that KIC, followed by Leu, the compounds that most accumulate in DXB, reaching plasma concentrations of 5 mM, impaired the mitochondrial homeostasis in brain of rats. In the case of the present data be extrapolated to human conditions, it may be presumed that the mitochondrial dysfunction might be involved in the brain damage observed in MSUD patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial;
ACR – aminoácidos de cadeia ramificada;
ADP - adenosina-5'-difosfato;
ANOVA – análise de variância de uma via;
ATCR - aminotransferase de cadeia ramificada;
ATP - adenosina-5'-trifosfato;
BSA – albumina bovina sérica;
 α -CGDH - α -cetoglutarato desidrogenase;
CIC - ácido α -cetoisocapróico;
CIV - ácido α -cetoisovalérico;
CMV - ácido α -ceto- β -metilvalérico;
CCR – α -cetoácidos de cadeia ramificada;
CDCCR - complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada;
CS – citrato sintase;
DCIP – dicloroindofenol;
DMSO – dimetil sulfóxido;
DTNB - 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato);
DXB – doença do xarope do bordo;
EGTA – ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetraacético;
FAD - flavina adenina dinucleotídeo;
FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo reduzido;
HCR – hidroxiácidos de cadeia ramificada;
HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico;
HIC - ácido α -hidroxiisocapróico;
HIV - ácido α -hidroxiisovalérico;
HMV - ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico;
IDH – isocitrato desidrogenase;
Iso – isoleucina;
Leu – leucina;

MDH – malato desidrogenase;

MOPS – ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico;

NAD⁺ - adenina dinucleotídeo;

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido;

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido;

RCR – razão de controle respiratório;

SDH – succinato desidrogenase;

SPSS - statistical Package for the Social Sciences;

Val – valina.

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Erros inatos do metabolismo são distúrbios hereditários, majoritariamente de herança autossômica recessiva, cuja característica bioquímica principal é a deficiência ou ausência da atividade de uma enzima específica de uma rota metabólica. Além das enzimas, outras proteínas com função alterada como proteínas de transporte e proteínas estruturais, imunoglobulinas, hormônios, entre outras, podem estar afetadas nos erros inatos do metabolismo. O resultado deste bloqueio pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos e fluidos corporais ou à falta de substâncias essenciais, muitas vezes, acarretando prejuízo no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos afetados (Del Rio, 1962). Além disso, rotas alternativas também poderão originar outras substâncias possivelmente tóxicas.

I.1.2. Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada

Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Iso) correspondem a aproximadamente 40% dos aminoácidos essenciais nos indivíduos normais e 35% dos aminoácidos indispensáveis para o tecido muscular. O principal destino metabólico dos ACR é a incorporação em proteínas corporais (Schadewaldt e Wendel, 1997).

A via de catabolismo dos ACR tem início com o transporte destes aminoácidos para dentro da célula através do sistema de transporte L localizado na membrana plasmática. No interior das células os ACR sofrem três passos iniciais comuns na sua via metabólica. O primeiro passo é uma transaminação reversível catalisada pela aminotransferase de cadeia

ramificada, a qual existe em duas isoformas, sendo uma citosólica e a outra mitocondrial, produzindo os α -cetoácidos de cadeia ramificada (CCR) ácido α -cetoisocapróico (CIC) a partir de Leu, ácido α -ceto- β -metilvalérico (CMV) a partir de Iso e ácido α -cetoisovalérico (CIV) a partir de Val. Os CCR são então translocados para dentro da mitocôndria por um transportador específico onde sofrem descarboxilação oxidativa irreversível catalisada pelo complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR). A reação produz os respectivos acil-CoAs ramificada que são metabolizados por vias específicas. A Leu apresenta como produtos finais a acetil-CoA e o acetoacetato. A Val é convertida exclusivamente a succinil-CoA e a Iso produz acetil-CoA e succinil-CoA. Os ACR são, portanto, tanto cetogênicos quanto glicogênicos, servindo como precursores para a síntese de ácidos graxos e do colesterol e também servindo como substratos para a produção de energia via succinil-CoA e acetoacetato (Chuang e Shih, 2001) (Figura 1).

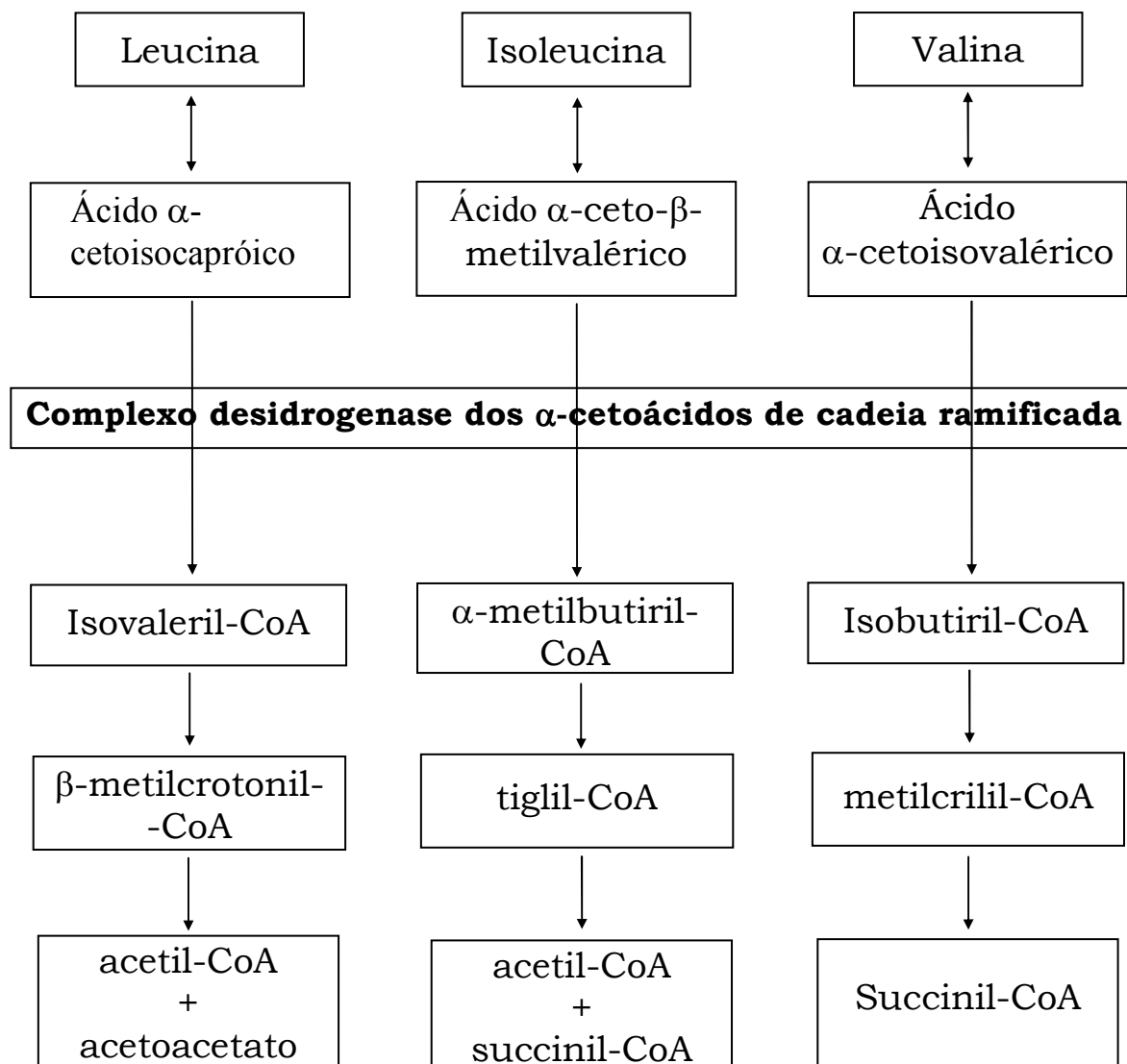


Figura 1 - Rota catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada, descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo alfa-cetoácido desidrogenase. (Adaptado de Scriver et al., 2001).

I.1.3. Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR)

O bloqueio metabólico na DXB foi demonstrado em 1960 por Dancis e colaboradores como sendo na descarboxilação dos CCR em leucócitos. O CDCCR é um complexo multienzimático localizado na membrana interna da mitocôndria das células de mamíferos (Yeaman, 1986; Chuang e Shih, 2001), envolvido na descarboxilação dos aminoácidos de cadeia ramificada Leu, Val e Iso (Nobukuni, 1992; Parrella et al., 1994; Chuang e Shih, 2001). Os produtos finais desta reação são CO_2 , acil-CoA de cadeia ramificada e NADH na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979). A atividade deste complexo regula o fluxo dos ACR usados para a produção de energia e é o passo irreversível da via catabólica. O complexo CDCCR é um membro do grupo de complexos de desidrogenases de α -cetoácidos bastante conservados e compreendendo o complexo piruvato desidrogenase, α -cetogluturato desidrogenase e o CDCCR que se apresentam com estrutura e função similares.

O complexo enzimático CDCCR possui três componentes catalíticos: uma α -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$) ou E1; uma di-hidrolipoil transacilase (24 subunidades idênticas), ou E2; e uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica, ou E3. Os componentes E1 e E2 são específicos para CDCCR enquanto a proteína E3 é também componente dos complexos α -cetogluturato e piruvato desidrogenase (Reed e Hackert, 1990). Além disso, o complexo CDCCR de mamíferos apresenta duas enzimas regulatórias: uma cinase e uma fosfatase específicas que regulam a atividade do complexo através dos ciclos de fosforilação (inativação)/defosforilação (ativação) de dois resíduos de serina da subunidade E1 α (Eisenstein et al., 1991; Peinemann e Danner, 1994).

Os passos da reação catalisados pelos três componentes da enzima são mostrados na figura 2. O componente E1 catalisa uma descarboxilação dos α -cetoácidos mediada pela tiamina pirofosfatase (Treacy et al., 1992; Peinemann e Danner, 1994; Chuang e Shih, 2001) reduzindo a molécula de lipoil covalentemente ligada a E2. A molécula do lipoil reduzida e o domínio lipoil servem como um braço móvel para transferir o grupo acil do componente E1 para a CoA, aumentando a quantidade de acil-CoA. Finalmente, o componente E3, que é fortemente ligado ao FAD, reoxida o resíduo de di-hidrolipoil do componente E2 tendo o NAD^+ como último acceptor de elétrons (Reed e Hackert, 1990; Chuang, 1998; Chuang e Shih, 2001). O resultado final da reação da desidrogenase dos CCR é a produção de acil-CoA de cadeia ramificada, CO_2 e NADH.

A cinase liga-se aos resíduos Ser-292 e Ser-302 do domínio E1 α , (Cook et al., 1983; Cook et al., 1983a; Lau et al. 1983; Paxton et al., 1986). Estudos iniciais apontam para uma possível ligação da fosfatase ao centro da subunidade E2 (Yeaman, 1989).

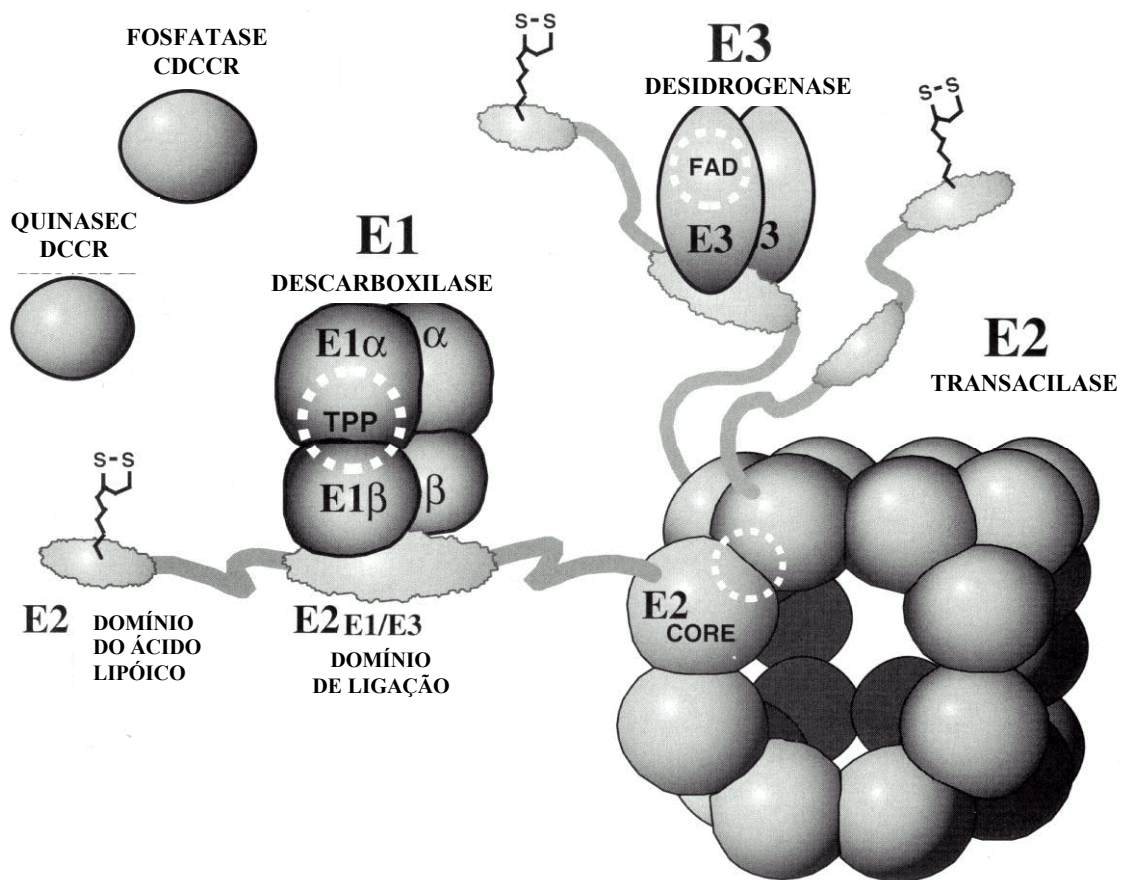


Figura 2 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang, 1998).

I.1.4. Doença do Xarope do Bordo

I.1.4.1. Histórico

Em 1954, Menkes e colaboradores descreveram uma doença degenerativa cerebral em quatro membros de uma mesma família. A manifestação do quadro clínico se dava na primeira semana de vida com prognóstico fatal nos três meses subsequentes. O achado mais proeminente foi um odor forte de açúcar queimado na urina dos pacientes, o que deu origem ao nome “Doença do Xarope do Bordo” (DXB). Em 1957, Westall e colaboradores

observaram outro paciente e encontraram concentrações muito altas dos aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Iso e Val). Em 1959, Menkes isolou na urina dos pacientes os CCR (CIC, CIV e CMV) que se derivam dos aminoácidos acima citados.

I.1.4.2. Etiologia

A DXB é um distúrbio metabólico de herança autossômica recessiva causada pela deficiência na atividade do CDCCR (Nobukuni et al., 1992; Chuang & Shih, 2001). Esta deficiência enzimática resulta no acúmulo dos ACR Leu, Val e Iso, bem como de seus respectivos CCR CIC, CIV e CMV. Da mesma forma são encontrados em concentrações elevadas os hidroxiácidos derivativos correspondentes (HCR) ácido α -hidroxiisocapróico (HIC), ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e ácido 2-hidroxi-3-metilvalérico (HMV), com especial ênfase para o HIV (Figura 3). Os compostos que mais se acumulam nessa doença são a leucina e o CIC que atingem uma concentração plasmática de 5 mM (Tanaka e Rosenberg, 1983) e o HIV que se encontra em níveis de 1 mM (Shigematsu et al., 1983; Treacy et al., 1992) no plasma dos pacientes durante as crises de descompensação metabólica.

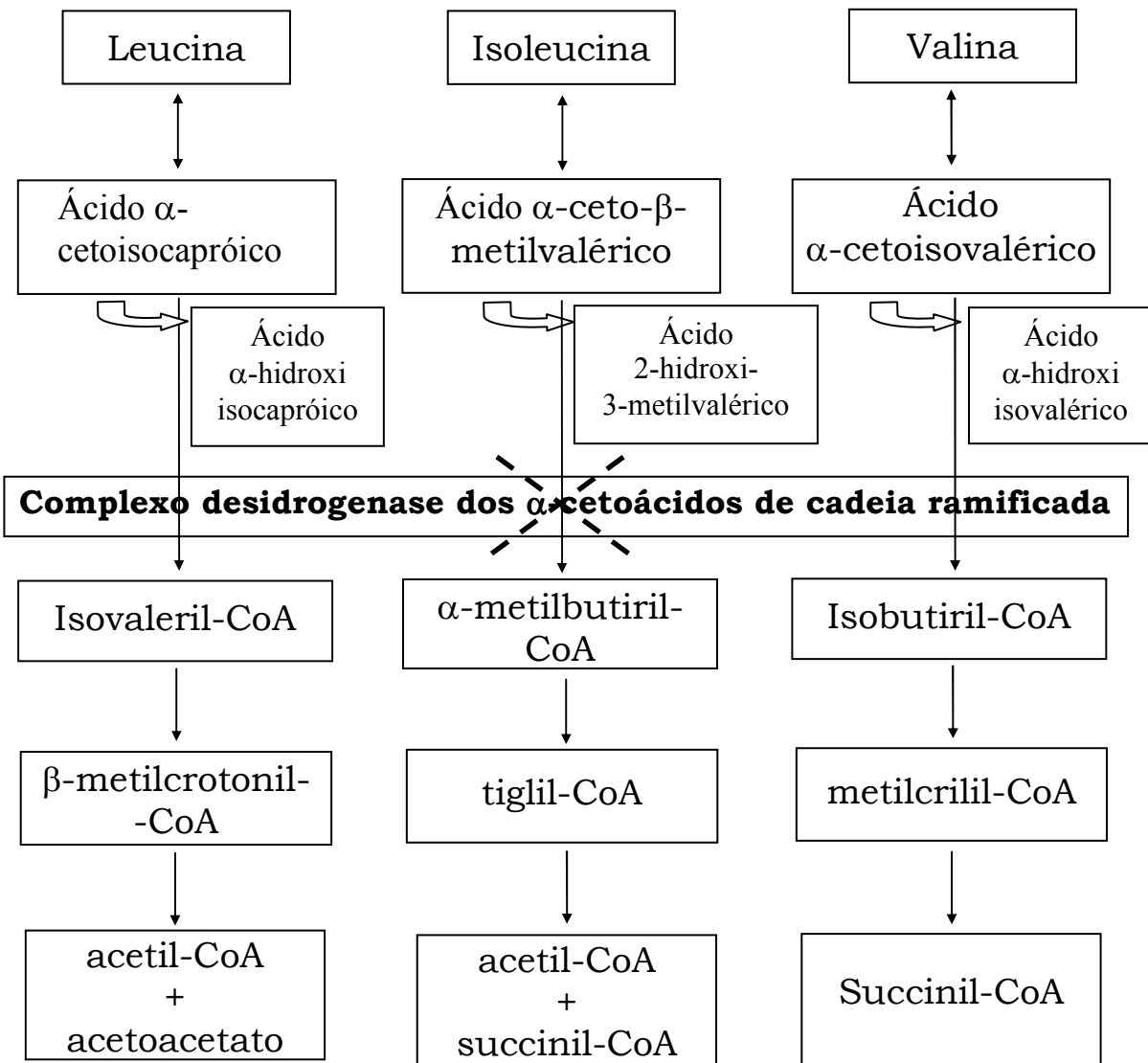


Figura 3 - Rotas catabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. As duas primeiras reações comuns são catalisadas pelas seguintes enzimas: transaminação reversível pela aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada, descarboxilação oxidativa dos cetoácidos de cadeia ramificada e esterificação da coenzima A pelo complexo α-cetoácido desidrogenase. Em destaque é mostrada a etapa em que a enzima é deficiente nos pacientes com DXB e os metabólitos que se acumulam nessa doença (Adaptado de Scriver et al., 2001).

I.1.4.3. Diagnóstico da Doença do Xarope do Bordo

O diagnóstico da DXB é fundamentalmente laboratorial através da identificação de concentrações plasmáticas e urinárias elevadas de Leu, Iso e Val ou de seus respectivos α -cetoácidos através de cromatografia de aminoácidos e ácidos orgânicos, respectivamente. Como mencionado anteriormente, são encontradas concentrações elevadas dos metabólitos Leu, CIC e HIV (1-5 mM) em plasma de pacientes não tratados. Os outros metabólitos também possuem concentrações plasmáticas elevadas, porém menores. Além disso, foi observado que as concentrações desses metabólitos são próximas a 1 mM em líquido cefalorraquidiano (Shigematsu et al., 1983). Muitas regiões dos Estados Unidos e outros países utilizam um programa de triagem em massa para identificar neonatos com níveis plasmáticos de Leu acima de 2 mg/dL (153 μ M), indicativos da doença (Danner e Elsas, 1989).

A presença de quantidades mensuráveis de L-aloisoleucina no plasma, um produto da racemização da Iso, tem sido considerada patognomônica para a doença. No entanto, demonstrou-se que a formação da L-aloisoleucina não está associada somente a DXB, pois ocorre tanto em cultura de células normais *in vitro* como também em pessoas normais *in vivo*. Na análise de rotina dos aminoácidos, no entanto, a L-aloisoleucina é indetectável no plasma de indivíduos saudáveis devido à sua baixa concentração e à presença de compostos interferentes (Schadewaldt et al., 1990).

A confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade do CDCCR em cultura de leucócitos periféricos dos pacientes (Peinemann e Danner, 1994).

O diagnóstico pré-natal da DXB pode ser realizado em cultura de células do fluido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14ª e a 18ª semana de gestação, ou por análise

direta do tecido em vilosidades coriônicas e cultura de células de vilosidades coriônicas (Kleijer et al., 1985; Chuang e Shih, 2001).

I.1.4.4. Fenótipos clínicos

I.1.4.4.1. Clássico

A forma clássica da DXB corresponde a 80% dos casos e apresenta um quadro neonatal de encefalopatia e representa o fenótipo mais grave e comum da doença. Os níveis dos ACR e CCR, particularmente de Leu e CIC, estão muito aumentados no sangue, chegando a 5 mM, bem como no líquido cefalorraquidiano e na urina dos pacientes afetados. A atividade do CDCCR em fibroblastos ou cultura de linfócitos encontra-se usualmente menor que 2% quando comparada à atividade normal da enzima. Os pacientes afetados apresentam-se normais ao nascimento e os sintomas que se desenvolvem geralmente entre o 4º e o 7º dia de vida incluem letargia, recusa alimentar, alterações neurológicas progressivas como hipotonia e hipertonia, cetose, odor de açúcar queimado na urina, hipoglicemia, convulsões e coma.

A maioria dos pacientes, quando não tratados, morre nos primeiros meses de vida em decorrência de crises metabólicas recorrentes e de deterioração neurológica, frequentemente precipitada por infecções ou outros eventos relacionados ao catabolismo, tais como vacinações ou cirurgias (Chuang e Shih, 2001).

I.1.4.4.2. Intermediário

Pacientes com a forma intermediária apresentam elevações persistentes dos ACR, porém menores do que as verificadas na forma clássica (acompanhadas por

comprometimento neurológico), mas não apresentam sintomas severos no período neonatal. Muitos casos não apresentam episódios de descompensação metabólica aguda. A atividade residual da enzima é geralmente maior do que a apresentada no fenótipo clássico e varia entre 3 a 30% da normal, embora existam relatos de níveis menores (Fischer & Gerritsen, 1971; Muller et al., 1971; Gonzales-Rios et al., 1985). O diagnóstico geralmente ocorre entre 5 meses a 7 anos de idade em decorrência de atraso no desenvolvimento e/ou convulsões e cetoacidose, embora encefalopatia aguda raramente ocorra.

I.1.4.4.3. Intermitente

Pacientes apresentam um desenvolvimento inicial normal, com crescimento e inteligência normais. No entanto, eles apresentam risco de sofrerem descompensação metabólica durante situações de estresse. No período assintomático da doença os níveis dos ACR são normais. A atividade enzimática situa-se entre 5 a 20% da normal. Os sintomas iniciais normalmente surgem entre os 5 meses e 2 anos de vida em associação com otite média ou outras infecções. Os episódios de mudanças agudas no comportamento e dificuldade de caminhar podem evoluir para crises de descompensação com choque e coma. Os perfis de ACR e CCR nestes casos equiparam-se ao do fenótipo clássico da DXB durante as crises (Chuang e Shih, 2001).

I.1.4.4.4. Tiamina-responsivo

Normalmente, estes pacientes não apresentam doença neonatal aguda e suas manifestações clínicas são semelhantes às da forma intermediária. A concentração de ACR no plasma é cerca de 5 vezes maior que o normal. Estes níveis (2-5 mM) são reduzidos abruptamente para níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina e com dieta

restrita em proteínas. A atividade enzimática situa-se entre 2 a 40% da normal. As manifestações clínicas e laboratoriais mais frequentes são descompensação metabólica e acidose, acompanhada de desenvolvimento físico normal (Chuang e Shih, 2001).

I.1.4.4.5. Diidrolipoil desidrogenase (E3)-deficiente

A deficiência de E3 é um distúrbio raro. Apresenta sinais clínicos semelhantes aos da forma intermediária, mas é acompanhada de acidose láctica grave. O perfil de ácidos orgânicos na urina exibe anormalidades encontradas tanto na acidose láctica como na DXB. O lactato, o piruvato, o α -cetoglutarato, o α -hidroxiiisovalerato e o α -hidroxiglutarato estão aumentados neste fenótipo. A hiperalaninemia secundária ao acúmulo de piruvato é também frequente. Os ACR estão leve ou moderadamente aumentados no plasma, quando comparados aos níveis encontrados na forma clássica. Estes pacientes têm deficiência das três enzimas desidrogenases em que E3 é um componente, a α -cetoglutarato desidrogenase, a piruvato desidrogenase e o CDCCR. Os pacientes que apresentam este fenótipo normalmente não apresentam sintomatologia nos primeiros meses de vida. Quando surge acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de idade, ocorre a deterioração neurológica progressiva caracterizada por hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia similar a de Leigh. (Chuang e Shih, 2001). Os resultados dos tratamentos com doses farmacológicas de tiamina, biotina, e ácido lipóico, combinados com restrição na dieta de gorduras e ACR não têm se revelado satisfatórios.

I.1.4.4.6. Aspectos genéticos

A DXB é uma desordem metabólica autossômica recessiva. A frequência mundial é

de 1 para 100.000 nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001; Mackenzie e Woolf, 1959). Esta incidência inclui o fenótipo clássico e as formas variantes da doença, à exceção dos pacientes com o fenótipo intermediário da doença. Em países cujo casamento consanguíneo é comum (Turquia, Arábia Saudita, Espanha e Índia), a ocorrência é mais elevada. A DXB é altamente prevalente nas populações Menonitas dos condados de Lancaster e Lebanon no estado da Pensilvânia/EUA. Toda a população Menonita afetada apresenta o fenótipo clássico da doença devido a uma mutação genética única na subunidade E1 α (Chuang e Shih, 2001).

I.1.4.5. Neuropatologia

I.1.4.5.1. Achados neuropatológicos

Na maioria dos pacientes com DXB observa-se encefalopatia com edema cerebral generalizado podendo haver também a formação de edema intenso localizado envolvendo o tronco cerebral dorsal, os pedúnculos cerebrais e a cápsula interna. Estudos relataram também a ocorrência de hipodensidade difusa no globo pálido e tálamo afetando a substância branca destas regiões, o que é um indicativo de hipomielinização (Treacy et al., 1992). A fase aguda do edema também é seguida por alargamento do sulco sobre os lobos frontais e das fissuras inter-hemisférica e silviana, indicando atrofia cerebral. O trato piramidal da medula espinal, a mielina que circunda o núcleo dentado, o corpo caloso e os hemisférios cerebrais são os mais afetados. Paralelamente à deficiência de mielina, observa-se redução dos oligodendrócitos. Relatos demonstram alterações expressivas no cerebelo com pancrose da camada de células granulares com preservação das células de

Purkinje. Nos núcleos da base e substância negra observou-se perda neuronal considerável (Chuang e Shih, 2001).

Os achados radiológicos mais recentes apontam sinais aumentados em neuroimagens (T2) compatíveis com modificações no conteúdo aquoso na substância branca característico da desmielinização. As áreas mais comumente afetadas são: mesencéfalo, tronco cerebral, tálamo e o globo pálido; as lesões supratentoriais são vistas somente nos casos mais severos (Schonberger et al., 2004).

A correlação das concentrações plasmáticas dos ACR e CCR com os achados de neuroimagem revelou que o aumento destes metabólitos era acompanhado por uma difusão protônica marcadamente restrita, compatível com edema citotóxico ou da bainha intramielínica no tronco cerebral, nos gânglios basais, no tálamo, no cerebelo, na substância branca periventricular e no córtex cerebral (Jan et al., 2003).

I.1.4.5.2. Tratamento

O tratamento dos pacientes com DXB consiste basicamente em restrição dos ACR da dieta para minimizar os efeitos do acúmulo dos metabólitos acumulados, principalmente no sistema nervoso central. O objetivo do tratamento é normalizar as concentrações dos ACR sem prejudicar o crescimento e desenvolvimento dos pacientes e para tanto, deve ser iniciado o mais cedo possível e ainda no período neonatal. Administra-se um leite especial com concentrações reduzidas de Leu, Val e Iso (Snyderman et al., 1964). Outras preparações dietéticas específicas para pacientes com DXB também foram desenvolvidas. A terapia com tiamina (50 a 300 mg/dia) por 3 semanas é empregada no início do tratamento para a detecção de pacientes com a doença tiamina-responsível (Chuang e Shih, 2001).

Em casos mais graves tem sido utilizado o transplante de fígado, substituindo o órgão com gene alterado por um órgão normal. Desta forma, os aminoácidos de cadeia ramificada podem ser metabolizados normalmente.

Na fase aguda, emprega-se um tratamento mais agressivo, pois o aumento na concentração dos ACR e CCR, geralmente precipitado por infecções ou outros estresses, leva à deterioração das funções cerebrais. Três medidas devem ser tomadas para o controle das crises metabólicas: remoção dos metabólitos tóxicos; promoção de suporte nutricional adequado e minimização do catabolismo e/ou promoção do anabolismo. Supõe-se que promover o anabolismo pode ser um dos mais importantes fatores no controle da descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001). A diálise peritoneal e a transfusão sanguínea são utilizadas para a remoção dos metabólitos com melhora significativa e rápida do quadro neurológico. No entanto, a hemodiálise é mais eficaz na depuração dos ACR e dos CCR do plasma do que a diálise peritoneal. A diálise peritoneal é um procedimento relativamente simples, enquanto que a hemodiálise requer um equipamento sofisticado e treinamento especializado. Desenvolveu-se, para os pacientes com DXB, uma terapia com nutrição parenteral que inclui uma mistura de ACR em combinação com glicose, lipídios, eletrólitos e vitaminas a fim de proporcionar uma nutrição balanceada. Esta preparação é utilizada nos casos de descompensação metabólica moderada ou em combinação com outras terapias na descompensação metabólica severa. Uma terapia alternativa consiste em evitar o estado catabólico com administração de insulina e glicose (Rogers et al., 1962; Wendel, et al., 1982). Deve-se, no entanto, enfatizar que um grau variável de comprometimento da cognição é observado na maioria dos pacientes com DXB, os quais foram submetidos a um tratamento aparentemente adequado, sugerindo que o tratamento para esta doença deva ser melhorado.

I.1.4.5.3. Fisiopatologia do dano neurológico

Os mecanismos tóxicos dos ACR e CCR sobre o cérebro ainda não foram totalmente elucidados, mas diversos estudos têm contribuído para o entendimento das suas ações sobre o sistema nervoso central. Alguns fatores, tais como a complexidade do desenvolvimento do cérebro, as concentrações alcançadas pelas toxinas e o estágio do desenvolvimento cerebral em que elas atuam prejudicam o esclarecimento destes efeitos.

Tashian, em 1961, demonstrou que o CIC e o CIV inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de rato. Os hidroxiácidos HIC e HIV também apresentaram o mesmo efeito, mas em menor grau. Desta forma, estes metabólitos poderiam reduzir a produção de GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Foi também verificada uma perda marcante no número de receptores pós-sinápticos GABA_A demonstrada por ligação de [³H]diazepam em um modelo animal de DXB em bovinos (Dodd et al., 1992). Além disso, foi verificado que os cetoácidos CIC, CIV e CMV inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos (Gibson e Blass, 1976). Esses investigadores demonstraram que estes cetoácidos também inibem a enzima ácido graxo sintetase, além de inibir a oxidação do piruvato em cérebro de ratos, o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase. Os aminoácidos Val e Iso, por sua vez, inibiram alostericamente a enzima piruvato cinase em cérebro de ratos. Outros achados mostraram que o excesso de Leu na dieta provoca uma diminuição da serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965). Finalmente, como uma propriedade da Leu é estimular a secreção de insulina, Panten e colaboradores (1972) propuseram que essa ação poderia explicar os

episódios de hipoglicemia apresentados pelos pacientes com a DXB.

Dentre os cetoácidos acumulados na doença, o CIC é considerado o mais tóxico. O CIC inibe o consumo de oxigênio em cérebro de ratos, a oxidação do 3-hidroxiacetato (Gibson e Blass, 1976) e provoca deficiência na formação da mielina no cerebelo de ratos. Alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de Leu altera a concentração no sistema nervoso central dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, Val, Isso, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina (Araújo et al., 2001). Desta forma, a biossíntese de alguns neurotransmissores cerebrais como as catecolaminas e a serotonina poderia estar afetada pela diminuição na concentração cerebral de alguns destes aminoácidos (Huang et al., 1996; Zielke et al., 1996). Estes mesmos autores observaram que a adição de CIC à cultura de astrócitos de rato diminui o conteúdo de glutamato aumentando sua velocidade de oxidação. O mecanismo sugerido foi a transferência do grupo amino do glutamato para o CIC levando a formação de Leu e α -cetoglutarato que é oxidado no ciclo de Krebs. Também se demonstrou que, além de aumentar a velocidade de oxidação de glutamato, níveis elevados de CIC também aumentam a oxidação da glutamina (Zielke et al., 1997) e inibem a síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Yudkoff et al., 1994).

Na presença de um excesso de CIC, o conteúdo de glutamato intracelular em cultura de astrócitos diminui em cerca de 50% (Yudkoff et al., 1993; Yudkoff et al., 1994). Outro efeito importante parece ser o da Leu ao ativar alostericamente a enzima glutamato desidrogenase (Yielding e Tomkins 1961). Estudos subsequentes demonstraram ativação semelhante em mitocôndrias de ratos (Coué e Tipton, 1989) e em sinaptossomas (Erecinska e Nelson, 1990).

Jouvet e colaboradores (2000) descreveram efeitos deletérios dos ACR e CCR sobre a viabilidade celular de fibroblastos cultivados da pele de um paciente com DXB. Pela proposição dos autores, a apoptose foi ativada pela presença de níveis de ACR e CCR semelhantes aos encontrados nos pacientes. Além disso, Funchal e colaboradores (2004a) demonstraram, em cultura de astrócitos, que os CCR levam a morte celular em concentrações comparáveis às observadas em indivíduos afetados e que estão no estado de descompensação metabólica. Demonstraram ainda que os CCR alteram a fosforilação de proteínas do citoesqueleto celular, levando à reorganização da actina e da GFAP (proteína ácida fibrilar glial) do citoesqueleto (Funchal et al., 2002; Pessoa-Pureur et al., 2002; Funchal et al., 2004), bem como observaram que as células gliais tratadas com estes metabólitos apresentam morfologia distinta das células controles, distinguindo-se da característica poligonal e apresentando uma distribuição fusiforme (Funchal et al., 2004a).

Além disso, estudos *in vitro* de metabolismo energético cerebral apontam para uma redução na atividade da enzima creatina cinase em homogeneizado de cérebro na presença de concentrações elevadas de ACR, mas não de CCR (Pilla et al., 2003). Efeitos inibitórios *in vitro* dos CCR sobre a produção de CO₂ e a atividade do complexo I-III (50-60 % de diminuição) devido a um bloqueio na atividade do complexo I também foram encontrados, sem que tenham sido demonstrados efeitos na liberação de lactato, utilização de glicose ou ainda na atividade dos outros complexos da cadeia de transporte de elétrons (Sgaravatti, 2003).

Outros resultados em cérebro de ratos indicam a indução de peroxidação lipídica e redução da capacidade cerebral em modular eficientemente os danos associados com uma produção aumentada de radicais livres pelos ACR, CCR e HCR que se acumulam na DXB (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003).

Em relação à neurotransmissão glutamatérgica, resultados apontam para uma diminuição da captação de glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos jovens. Foi demonstrado que os CCR e ACR inibem a captação de glutamato em concentrações similares a de pacientes em descompensação metabólica, sendo sugerido inclusive um mecanismo de inibição competitiva entre estes metabólitos (Reis et al., 2000; Tavares et al., 2000).

Alterações comportamentais também têm sido atribuídas aos ACR e CCR acumulados na DXB. Utilizando um modelo crônico de injeções de Leu, Mello e colaboradores (1999) induziram déficit comportamental de longa duração quando os ratos eram submetidos a duas tarefas distintas de aprendizado (habituação ao campo aberto e esquiva ativa de duas vias). Além disso, Coitinho e colaboradores (2001) investigaram o efeito da administração intraestriatal dos CCR que se acumulam na DXB sobre o comportamento convulsivante de ratos adultos. Os resultados revelaram a indução de convulsões após a injeção do CIV e que estas podem ser mediadas através de mecanismos de controle gabaérgicos e glutamatérgicos. Além disso, Vasques e colaboradores (2005) demonstraram que os HCR prejudicam a cognição, podendo estar envolvidos na neuropatologia, atraso psicomotor e retardo mental observados nos pacientes acometidos pela DXB.

Deve-se enfatizar, no entanto, que a fisiopatologia da disfunção neurológica presente nos pacientes com DXB ainda não está completamente esclarecida.

I.1.5. Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o O_2 é reduzido a H_2O , por elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$, que fluem através de vários pares redox (cadeia

transportadora de elétrons), gerando ATP a partir de ADP e Pi (Nelson & Cox, 2000). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais especificamente na membrana mitocondrial interna (cadeia respiratória), sendo responsável pela maior parte da energia produzida pela célula. As mitocôndrias são organelas envoltas por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons (Nelson & Cox, 2000). A membrana interna contém transportadores específicos para a passagem de substâncias como o piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (Abeles et al., 1992). O fluxo de elétrons do NADH e FADH₂ até o O₂ se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons). Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos (NADH e o FADH₂), os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons e o O₂, que é o aceptor final dessa cadeia de reações de oxidação.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona. O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidorreductase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (succinato desidrogenase) reduz a ubiquinona com elétrons do FADH₂ provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III, citocromo *bc₁* ou ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductase, catalisa a redução do citocromo *c* a partir da ubiquinona reduzida. Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV (citocromo *c* oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo *c* para O₂, formando H₂O. São necessárias quatro moléculas de citocromo *c* para reduzir completamente uma molécula de O₂. Todos esses

complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (Abeles et al., 1992). No entanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável às moléculas de NADH ou a $FADH_2$, necessitando sistemas de transferência desses equivalentes reduzidos do citosol para a matriz mitocondrial.

Nesse contexto, a oxidação do NADH formado no citosol é possibilitada por sistemas chamados lançadeiras, que transferem elétrons do NADH do citosol para a matriz, através de moléculas capazes de ser transportadas através da membrana mitocondrial interna. Existem duas lançadeiras para este fim, designadas de lançadeira do glicerol-3-fosfato e lançadeira do malato, conforme ilustra a figura 4. Uma vez formadas na matriz, as moléculas de NADH e $FADH_2$ podem ceder elétrons para os complexos I e II, respectivamente, suprindo a cadeia respiratória.

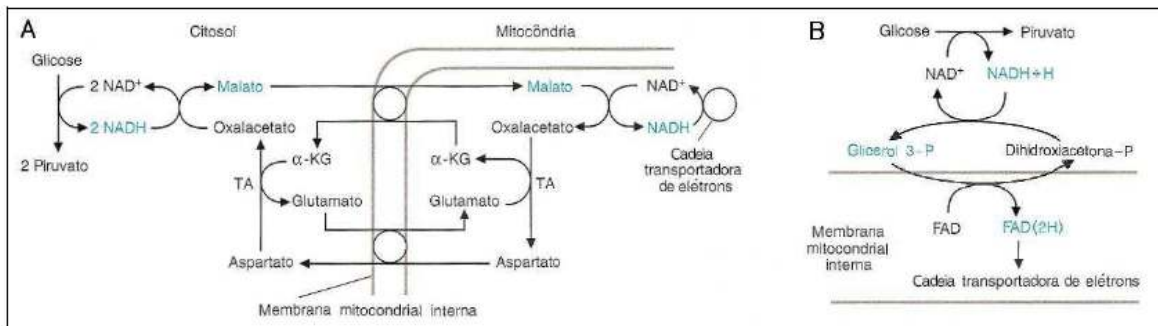


Figura 4. Lançadeira do malato (A) e lançadeira do glicerol-3-P (B) (Adaptado de Smith, Marks & Lieberman, 1996).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, gerando um potencial de membrana. Assim, cria-se um

gradiente eletroquímico transmembrana que pode ser utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Nelson & Cox, 2000).

Desse modo, a respiração mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de O_2 . Apesar do fato de que essa medida determina diretamente apenas a velocidade de uma única reação (transferência final de elétrons para O_2), muitas informações sobre outros processos mitocondriais podem ser obtidos simplesmente pela adaptação das condições de incubação. Vários passos podem ser investigados, incluindo o transporte de substratos através da membrana mitocondrial, a atividade das desidrogenases, a atividade dos complexos da cadeia respiratória, o transporte de nucleotídeos de adenina pela membrana mitocondrial, a atividade da ATP sintase e a permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons (Nicholls & Ferguson, 2001).

Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estágios, conforme ilustra a figura 5. No entanto, apenas os parâmetros estados 3 e 4 são comumente utilizados. O estado 3 representa o consumo de oxigênio quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável, são expostas a ADP, estimulando o consumo de O_2 e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado 4 reflete o consumo de O_2 após as mitocôndrias já terem sido depletadas de todo o ADP disponível, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante) (Nicholls & Ferguson, 2001).

A transdução de energia entre a cadeia respiratória e o gradiente eletroquímico de H^+ é bem regulada, sendo que um pequeno desequilíbrio termodinâmico entre ambos pode

resultar em uma alteração importante no transporte de elétrons pela mesma. Assim, quando o gradiente de prótons é dissipado pela ação da ATP sintase pela adição de ADP, há um desequilíbrio que estimula a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio. Sendo assim, para que a ATP sintase esteja ativa, são necessários dois fatores: disponibilidade de ADP e potencial de membrana suficientemente alto (Nelson & Cox, 2000). Nesse contexto, o acoplamento da respiração mitocondrial é definido como a capacidade da mitocôndria gerar energia (ATP) quando exposta ao ADP, ou seja, unir (acoplar) os processos de oxidação e de fosforilação. A dissipação do gradiente eletroquímico de prótons no espaço mitocondrial intermembranas, determinado por dano ou aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, desacopla o transporte de elétrons (oxidação) da síntese de ATP (fosforilação), resultando em um aumento do consumo de oxigênio (atividade respiratória aumentada) com reduzida formação de ATP (Nicholls & Ferguson, 2001).

Além disso, pode-se avaliar exclusivamente a parte oxidativa e, portanto, excluindo as etapas de fosforilação, no estado desacoplado da respiração mitocondrial (estado U), adicionando-se um desacoplador ao meio (Nicholls & Ferguson, 2001).

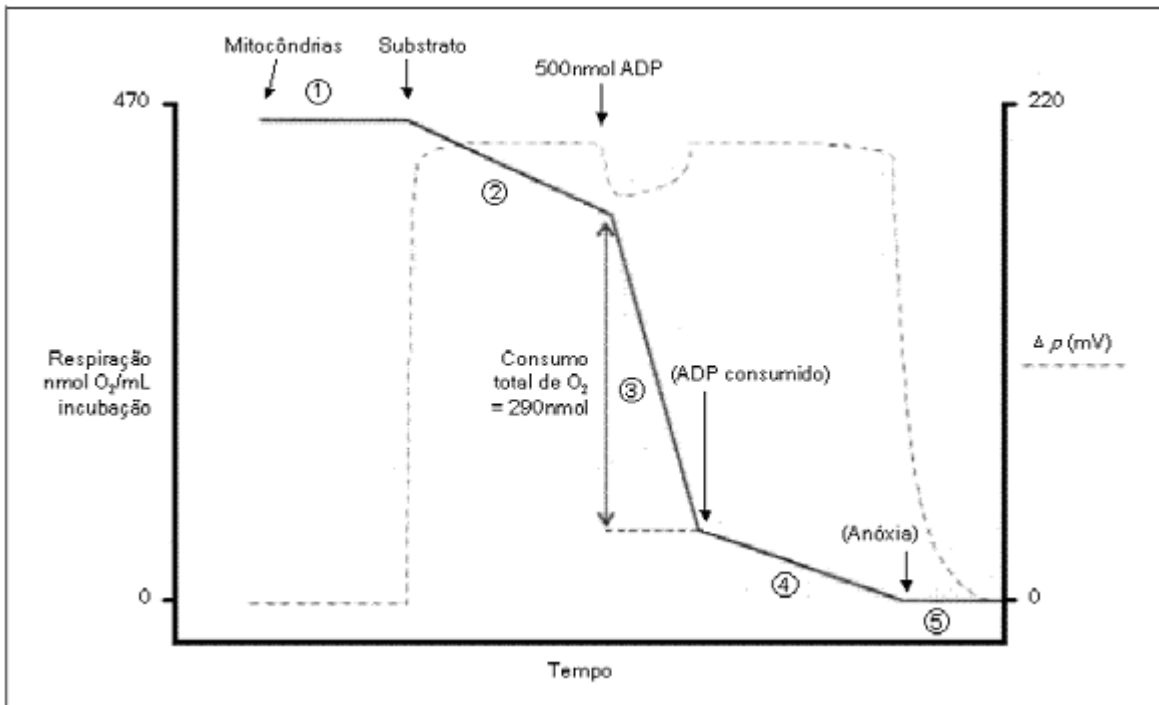


Figura 5. Estados da respiração mitocondrial (Adaptado de Nicholls e Ferguson, 2001).

Além da regeneração do ATP, que é a sua principal função, a mitocôndria desempenha outras funções importantes. Esta organela é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio e de defesas antioxidantes nas células (Cadenas & Davies, 2000), gerando ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com o oxigênio molecular no complexo III, em um processo que é dependente do potencial de membrana, e na matriz através de um sítio não definido do complexo I (Han et al., 2001). Além disso, a mitocôndria participa ativamente da homeostase de cálcio (Nicholls e Akerman, 1982) e está envolvida em diversos processos que levam à morte celular, incluindo liberação de citocromo c (Liu et al., 1996). Acredita-se que todos estes processos estejam interligados e que um desequilíbrio nessas funções possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica (Beal, 2007;

Sasaki et al., 2007; Gil & Rego, 2008; Reddy & Beal, 2008; Vila et al., 2008), e também em vários erros inatos do metabolismo (Schuck et al., 2002; Reis de Assis et al., 2004; Latini et al., 2005; Zugno et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Mirandola et al., 2008; Moshal et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Takamura et al., 2008; Viegas et al., 2008).

A disfunção mitocondrial pode ser detectada por alterações na medida da produção de espécies reativas, do potencial de membrana mitocondrial, do estado redox estimado pelo conteúdo de NAD(P)H/NAD(P)⁺, e pelo inchamento mitocondrial, que pode ser secundário à abertura do poro de transição mitocondrial.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo geral

Tendo em vista a importância do metabolismo energético para o sistema nervoso central e considerando que os mecanismos neurotóxicos na DXB ainda não estão completamente conhecidos, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito dos compostos que se acumulam em maiores concentrações na DXB (CIC, HIV e Leu) sobre diferentes parâmetros da função mitocondrial em cérebro de ratos jovens, no intuito de verificar alterações que possam contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentados pelos pacientes acometidos pela DXB.

I.2.2. Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do CIC, HIV e Leu, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4, índice de controle respiratório (RCR) e a

razão ADP/O, medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.

- Estudar os efeitos do CIC, HIV e Leu, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, sobre a atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico, a saber, α -cetoglutarato desidrogenase, citrato sintase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase e succinato desidrogenase, em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.
- Estudar os efeitos do CIC, HIV e Leu, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, sobre o potencial de membrana mitocondrial em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.
- Estudar os efeitos do CIC, HIV e Leu, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, sobre o conteúdo dos equivalentes reduzidos NADH e NADPH em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.
- Estudar os efeitos do CIC, HIV e Leu, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, sobre o inchamento mitocondrial em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.

PARTE II

Materiais e Métodos e Resultados

II.1. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1.1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tinham livre acesso à água e ao alimento (ração Supra ou Purina, São Leopoldo, RS). A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 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 1985).

II.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (P.A.). O aminoácido Leu e os ácidos CIC e HIV foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão utilizada na técnica no dia da realização dos ensaios e tiveram seu pH ajustado a 7,4.

Os reagentes utilizados foram:

Acetil-CoA – Sigma; Ácido oxaloacético – Sigma; ADP – Sigma; Azida sódica - Sigma; BSA – Sigma; α -Cetoglutarato – Sigma; CIC – Sigma; Coenzima A-SH - Sigma; Comassie - Sigma; DCIP – Sigma; Digitonina – Merck; DMSO – Nuclear; DTNB – Sigma; EGTA – Sigma; Glutamato – Sigma; HCl – Synth; HEPES – Sigma; HIV – Sigma; Isocitrato – Sigma; KCl - Synth; K_2HPO_4 – Synth; KH_2PO_4 – Synth; KOH – Synth; Leu –

Sigma; Malato – Sigma; Manitol – Nuclear; Metassulfato de fenazina – Sigma; $MgCl_2$ - Vetec; NADH – Sigma; Nuclear; MOPS – Sigma; $MnCl_2$ - Sigma; NAD^+ - Sigma; Oligomicina – Sigma; Rotenona – Sigma; Sacarose – Synth; Safranina O – Sigma; Succinato – Sigma; Tiamina pirofosfato - Sigma; Triton-X - Sigma; Trizma Base - Sigma.

II.1.3. Equipamentos e outros materiais

Agitador magnético Thermolyne modelo Maxi Mix Plus; Agitador de tubos Daigger; Balança BEL Engineering; Balança analítica digital Sartorius; Banho-maria Fisatom; Centrífuga refrigerada de alta velocidade Hitachi; Destilador; Eletrodo de Clark; Espectrofluorímetro Hitachi F-4500 com agitador magnético e temperatura controlada; Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5; Guilhotina; Ímã como agitador magnético; Leitor de microplacas M5 Molecular Devices; Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas; Membrana OD YSI; Micropipetas de volume regulável Gilson; Oxímetro 5100 YSI; Microplacas pretas e transparentes de 96 poços; Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal); Seringas Hamilton; Tubos plásticos Eppendorffs; Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, balões volumétricos, placas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensaio, funis, béqueres, cubetas, cubas.

II.1.4. Isolamento da Fração Mitocondrial

O isolamento da fração mitocondrial foi realizado de acordo com Rosenthal e colaboradores (1987). Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina e sem anestesia, a caixa craniana aberta e o seu conteúdo retirado e mantido sobre uma placa de vidro colocada sobre gelo. Os bulbos olfatórios e o tronco cerebral foram desprezados. O cérebro foi limpo, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos e a substância

branca das vias descendentes, e então homogeneizado em um tampão contendo 225 mM manitol, 75 mM sacarose, 1 mM EGTA, 0,1% BSA e 10 mM HEPES, pH 7,4 (tampão isolamento). O homogeneizado foi centrifugado a 2000 x g por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 x g por 8 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de tampão isolamento contendo 20 µL de digitonina 10% e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O próximo sedimento foi ressuspensionado em tampão isolamento sem EGTA e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento final contendo as preparações mitocondriais foi ressuspensionado em tampão de isolamento sem EGTA em uma concentração protéica final de aproximadamente 20 mg . mL⁻¹.

II.1.5. Avaliação de Parâmetros Respiratórios

A taxa de consumo de oxigênio foi medida polarograficamente, utilizando-se um eletrodo de Clark em um meio de incubação com agitação magnética e temperatura controlada (37°C) utilizando glutamato/malato (2,5 mM cada), 5,0 mM succinato mais rotenona (2 µg/mL) ou α-cetoglutarato (5,0 mM) como substratos respiratórios. CIC, HIV ou Leu (1,0-5,0 mM) foram adicionados ao meio de reação no início do ensaio. Preparações mitocondriais purificadas (0,5 mg proteína . mL⁻¹) incubadas num tampão contendo 300 mM sacarose, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 0,1% BSA e 5 mM MOPS (pH 7,4) foram utilizadas no ensaio. Após a depleção de substratos endógenos, o estado 3 da respiração mitocondrial foi iniciado pela adição de 1 mM ADP. Após a estabilização do consumo de oxigênio, adicionou-se ao meio de incubação 1 µg . mL⁻¹ de oligomicina A para induzir o estado 4 da respiração mitocondrial. A razão de controle respiratório (RCR) foi calculada como a razão entre estado 3 e estado 4. Os resultados dos estados 3 e 4 da respiração

celular foram expressos em nmol de O₂ consumido . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹. Também foi medida a razão ADP/O de acordo com Estabrook (1967), utilizando-se ADP em uma concentração final de 100 μM. Apenas preparações mitocondriais com RCR superior a 4 foram utilizadas nos experimentos.

II.1.6. Determinação da atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico

Para a avaliação da atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico, as preparações mitocondriais do cérebro de ratos jovens foram incubadas na presença do CIC, HIV ou Leu durante 30 minutos a 37° C e então as atividades enzimáticas foram determinadas.

II.1.6.1. Determinação da atividade da α-cetoglutarato desidrogenase (α-CGDH)

A atividade da enzima α-CGDH foi avaliada através da formação de NADH em um meio de incubação contendo K₂HPO₄ 50 mM, Triton X-100 0,1 %, MgCl₂ 1 mM, tiamina pirofosfato 0,2 mM, EGTA 0,2 mM, coenzima A-SH 0,12 mM, α-cetoglutarato 1 mM e NAD⁺ 2 mM, pH 7,35. A redução do NAD⁺ a NADH foi acompanhada em espectrofluorímetro a 37°C em comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente (Tretter e Adam-Vizi, 2004). A atividade enzimática foi expressa em nmol NADH. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

II.1.6.2. Determinação da atividade da citrato sintase (CS)

A atividade da enzima CS foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão contendo 300 mM sacarose, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 0,1% BSA e 5 mM MOPS (pH 7,4). A redução do DTNB a TNB foi medida

espectrofotometricamente a 412 nm por 3 minutos a 25°C (Srere, 1969). A atividade da citrato sintase foi expressa em nmol TNB. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

II.1.6.3. Determinação da atividade da isocitrato desidrogenase (IDH)

A atividade da enzima IDH foi realizada em um tampão Tris 33 mM, pH 7,4, contendo rotenona 10 µM, MnCl₂ 1,2 mM, ADP 0,67 mM, Triton X-100 0,1%, NAD⁺ 0,3 mM e isocitrato 5 mM. A redução do NAD⁺ a NADH foi acompanhada em espectrofluorímetro a 37°C em comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente (Plaut, 1969). A atividade enzimática foi expressa em nmol NADH. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

II.1.6.4. Determinação da atividade da succinato desidrogenase (SDH)

Para a medida da atividade da enzima SDH, ao meio de incubação contendo K₂HPO₄ 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 16 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 µM, foram adicionadas as mitocôndrias diluídas 1:20. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 µM, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 µM. A redução do DCIP foi determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985). A atividade enzimática foi expressa em nmol DCIP. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

II.1.6.5. Determinação da atividade da malato desidrogenase (MDH)

A atividade da enzima MDH foi medida em um tampão K₂HPO₄ 50 mM, pH 7,4, contendo Triton X-100 0,1 %, rotenona 10 µM, NADH 0,14 mM e ácido oxalacético 0,30

mM e a atividade foi determinada pela oxidação do NADH em espectrofluorímetro em comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente (Kitto, 1969). A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

II.1.7. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A medida do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi realizada de acordo com o método de Akerman e Wikström (1976), modificado por Kowaltowski e colaboradores (2002), seguindo a fluorescência do corante catiônico safranina O ($5 \mu\text{M}$) em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm, respectivamente, utilizando-se como substratos glutamato/malato ($2,5 \text{ mM}$ cada), succinato ($5,0 \text{ mM}$) mais rotenona ($2 \mu\text{g/mL}$) ou α -cetogluturato ($5,0 \text{ mM}$). Preparações mitocondriais purificadas ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$) incubadas num tampão contendo 150 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , $0,1 \text{ mM EGTA}$, 5 mM HEPES , $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $0,01 \%$ BSA e $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ oligomicina A (pH 7,2) foram utilizadas nos ensaios. Após cem segundos CIC, HIV ou Leu ($5,0 \text{ mM}$) foram adicionados ao meio de reação contendo as preparações mitocondriais. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.1.8. Medida do conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial

O conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente, utilizando-se glutamato/malato ($2,5 \text{ mM}$ cada) ou α -cetogluturato ($5,0 \text{ mM}$) como substratos. Preparações mitocondriais purificadas ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$) incubadas num tampão contendo 150 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , $0,1 \text{ mM EGTA}$, 5 mM

HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 0,01 % BSA e $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ oligomicina A (pH 7,2) foram utilizadas nos ensaios. Após cem segundos CIC, HIV ou Leu (5,0 mM) foram adicionados ao meio de reação contendo as preparações mitocondriais. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.1.9. Inchamento Mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi avaliado acompanhando-se o espalhamento de luz em um espectrofluorímetro, utilizando-se comprimentos de onda de excitação e emissão de 520 nm utilizando succinato (5 mM) mais rotenona ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) como substrato. Preparações mitocondriais purificadas ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram incubadas com CIC, HIV ou Leu (5 mM) num tampão contendo 150 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EGTA, 5mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 0,01 % BSA e $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ oligomicina A (pH 7,2) foram utilizadas nos ensaios. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.1.10. Determinação da Concentração Protéica

As proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

II.1.11. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e a média foi utilizada para análise estatística. Os dados foram analisados usando o programa SPSS versão 16,0 e os dados avaliados por análise de

variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de raios múltiplos de Duncan, quando o valor de F foi significativo. Os dados foram considerados significativos quando o $P < 0,05$.

II.2. RESULTADOS

II.2.1. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 6 mostra o efeito do CIC sobre parâmetros respiratórios utilizando glutamato/malato, succinato e α -cetogluturato como substratos respiratórios. Foi observado que o CIC estimulou significativamente o estado 4 da respiração mitocondrial com todos os substratos testados [A: Glutamato/Malato: $F_{(2,12)}=6,919$, $P < 0,01$; Succinato: $F_{(2,9)}=7,121$, $P < 0,01$; α -cetogluturato: $F_{(2,9)}=26,970$, $P < 0,001$] e diminuiu significativamente o RCR [C: Glutamato/Malato: $F_{(2,12)}=13,911$, $P < 0,001$; Succinato: $F_{(2,9)}=9,676$, $P < 0,01$; α -cetogluturato: $F_{(2,9)}=23,925$, $P < 0,001$]. Além disso, o CIC foi capaz de diminuir o estado 3 da respiração mitocondrial quando α -cetogluturato foi o substrato [B: $F_{(2,9)}=7,473$; $P < 0,01$]. Foi também observada uma redução na razão ADP/O na presença desse metabólito utilizando glutamato/malato ou α -cetogluturato como substratos respiratórios [D: Glutamato/Malato: $F_{(2,9)}=10,760$, $P < 0,01$; α -cetogluturato: $F_{(2,9)}=17,016$, $P < 0,001$].

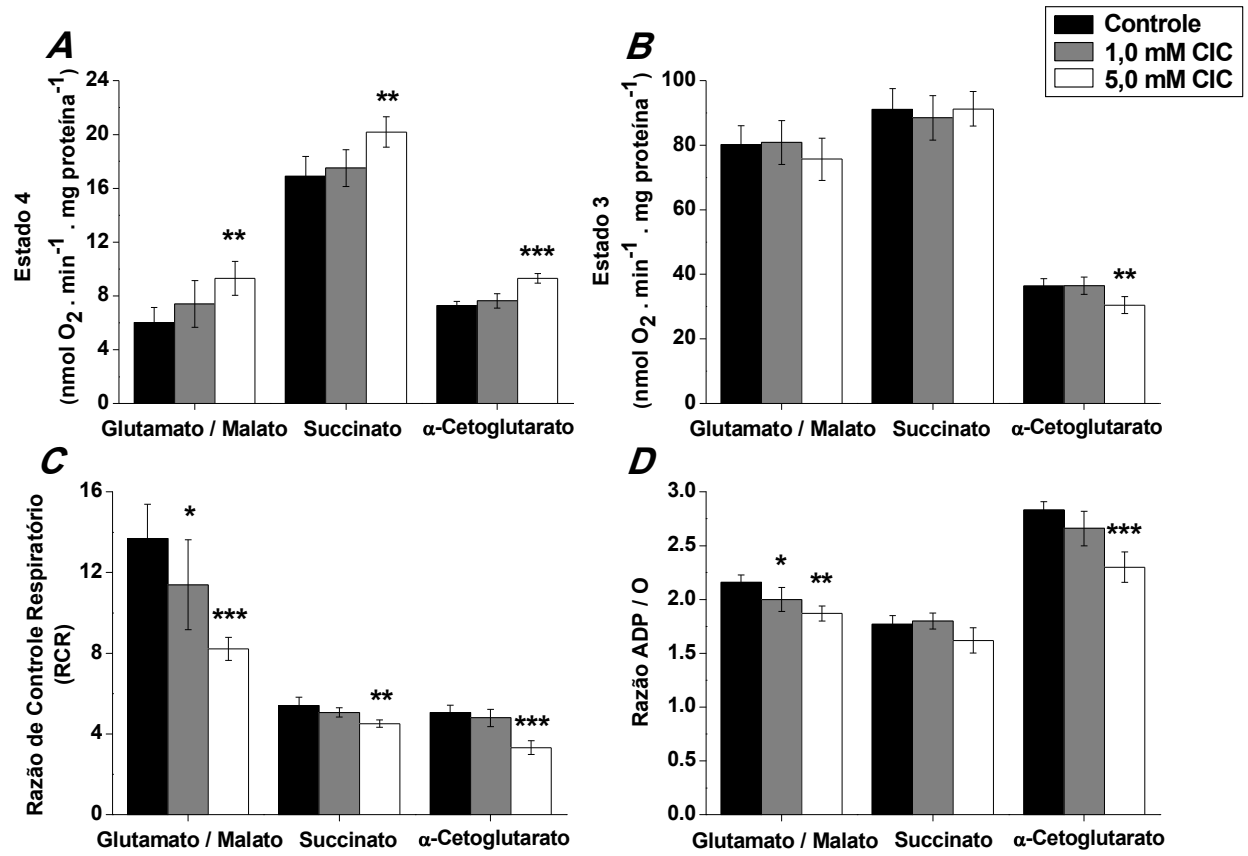


Figura 6. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos. Diferentes concentrações de CIC (1,0 - 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de incubação contendo preparações mitocondriais (0,5 mg proteína . mL⁻¹). Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 4 -5) e os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial são expressos como nmol O₂. min⁻¹. mg proteína⁻¹. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (**P*<0,05; ***P*<0,01; ****P*<0,001, comparados ao controle).

II.2.2. Efeito *in vitro* do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 7 mostra o efeito do HIV sobre parâmetros respiratórios utilizando glutamato/malato, succinato e α -cetogluturato como substratos respiratórios. Verificamos que o HIV não alterou de forma significativa nenhum dos parâmetros respiratórios testados.

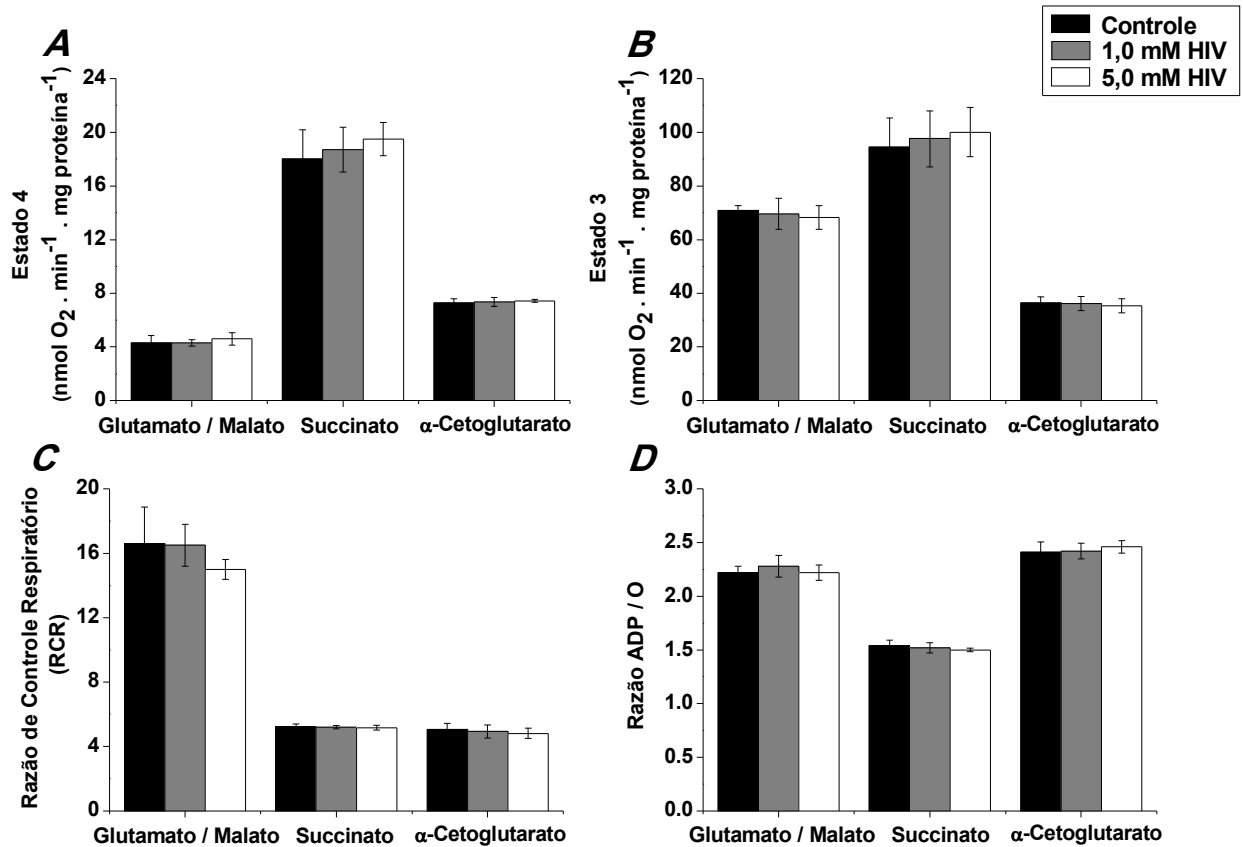


Figura 7. Efeito *in vitro* do α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos. Diferentes concentrações de HIV (1,0 - 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de incubação contendo preparações mitocondriais (0,5 mg proteína · mL⁻¹). Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 4 -5) e os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial são expressos como nmol O₂ · min⁻¹ · mg proteína⁻¹. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

II.2.3. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 8 mostra o efeito da Leu sobre parâmetros respiratórios utilizando glutamato/malato, succinato e α -cetoglutarato como substratos respiratórios. Podemos observar que a Leu foi capaz de inibir o estado 3 da respiração mitocondrial quando α -cetoglutarato foi utilizado como substrato [A: $F_{(2,9)}=5,196$, $P < 0,05$], sem alterar os demais parâmetros respiratórios testados.

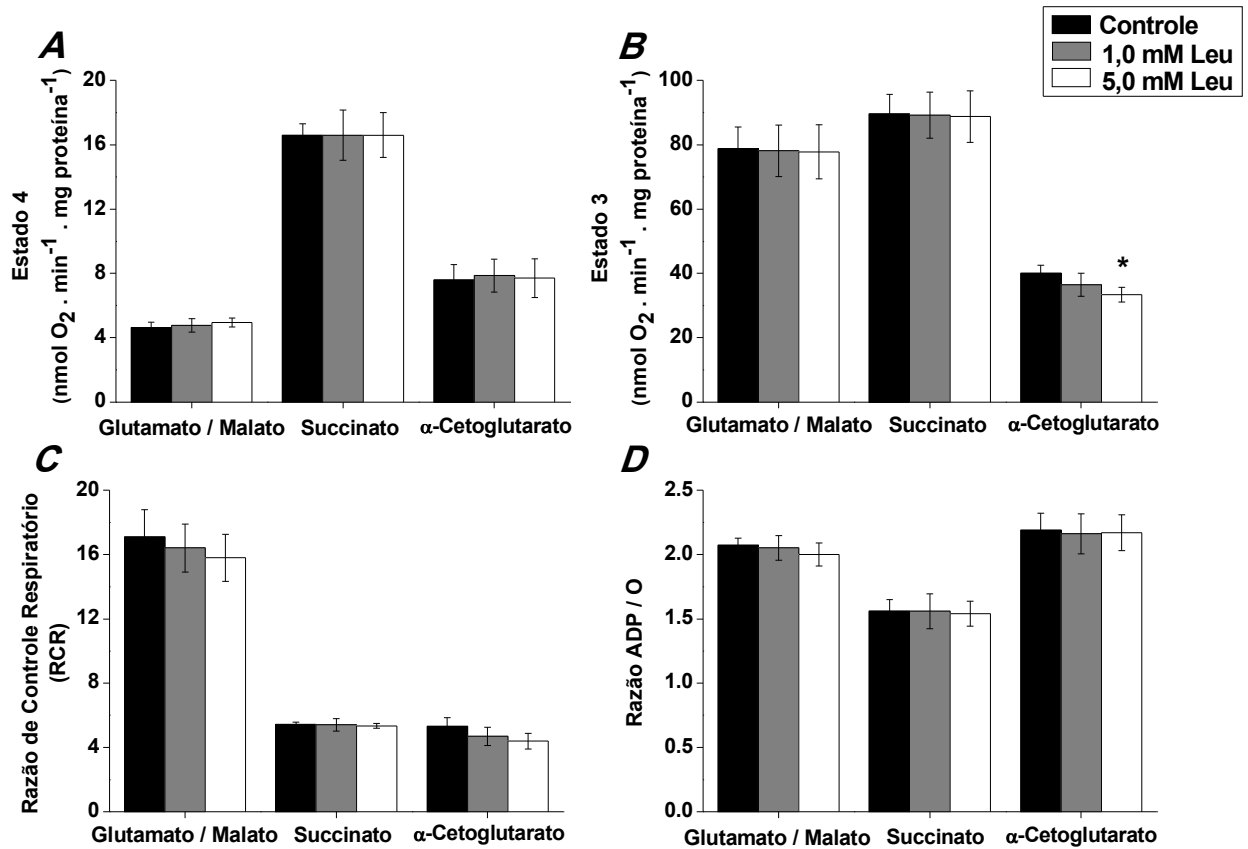


Figura 8. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos. Diferentes concentrações de Leu (1,0 - 5,0 mM) foram adicionadas ao meio de incubação contendo preparações mitocondriais (0,5 mg proteína · mL⁻¹). Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 4 -5) e os estados 3 e 4 da respiração mitocondrial são expressos como nmol O₂ · min⁻¹ · mg proteína⁻¹. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $P < 0,05$; comparados ao controle).

II.2.4. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

Tendo em vista que o CIC e a Leu inibiram o estado 3 da respiração mitocondrial quando α -cetoglutarato foi utilizado como substrato, sugerindo uma ação inibitória sobre a enzima α -CGDH, investigamos a ação dos metabólitos sobre a atividade dessa enzima. A figura 9 mostra os efeitos dos principais metabólitos acumulados na DXB na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima α -CGDH. Observamos que o CIC inibiu significativamente essa atividade enzimática [$F_{(3,20)}=22,044$; $P < 0,001$], enquanto que os demais metabólitos testados não causaram nenhum efeito. Além disso, avaliamos essa atividade enzimática na presença de diferentes concentrações de CIC e verificamos que o efeito inibitório [$F_{(4,25)}=32,065$; $P < 0,001$] apresenta um perfil dose-dependente [$\beta=-0,911$; $P < 0,001$], embora somente na concentração de 5,0 mM o CIC tenha apresentado um efeito significativamente diferente (Figura 10).

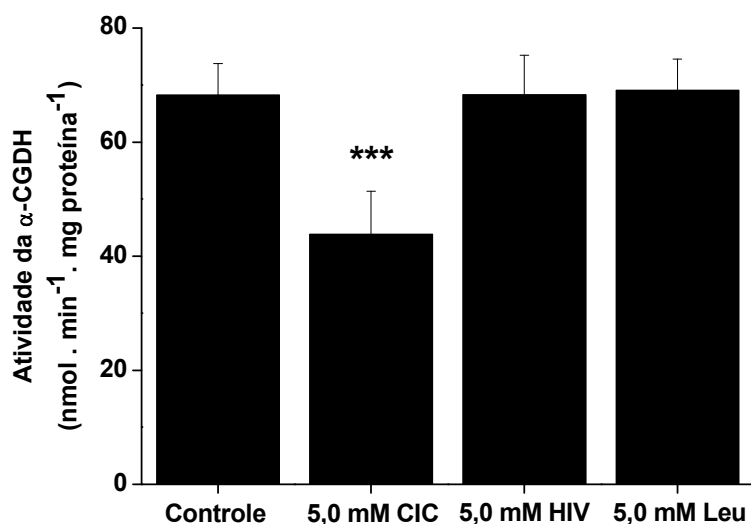


Figure 9. Efeito *in vitro* dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima α -cetogluturato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 6) e a atividade é expressa como nmol NADH . min⁻¹ . mg proteína⁻¹. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) ($P < 0,001$; comparados ao controle).

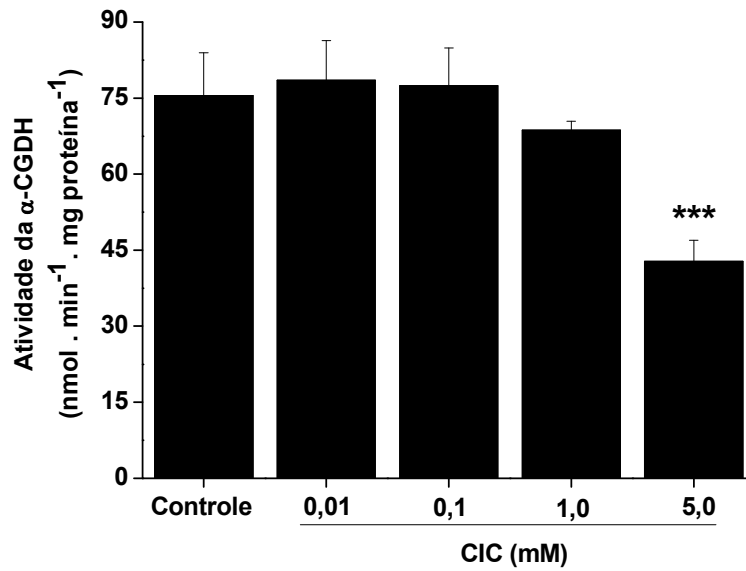


Figure 10. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre a atividade da α -cetoglutarato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 6) e a atividade é expressa como nmol NADH. min⁻¹. mg proteína⁻¹. O CIC foi adicionado na concentração de 0,01 - 5,0 mM. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $P < 0,001$; comparados ao controle).

II.2.5. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da citrato sintase (CS) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 11 mostra os efeitos do CIC, do HIV e da Leu, na concentração de 5,0 mM, sobre a atividade da CS. Verificamos que nenhum dos metabólitos foi capaz de alterar esta atividade enzimática.

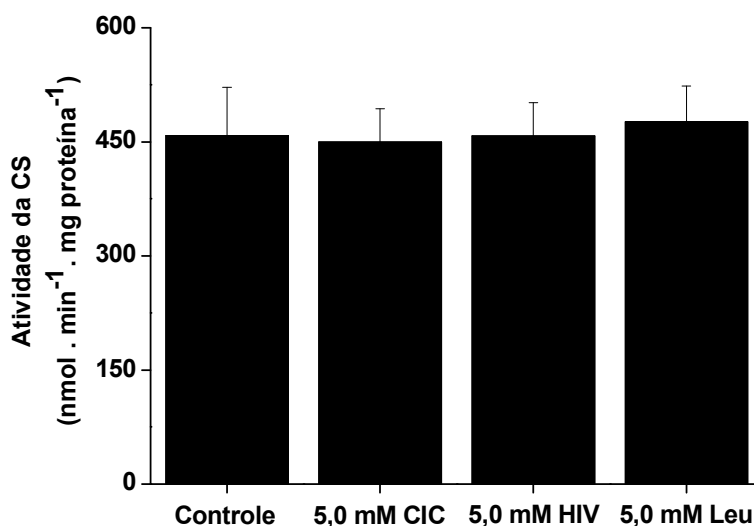


Figure 11. Efeito *in vitro* dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima citrato sintase (CS) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 6) e a atividade é expressa como nmol TNB. min⁻¹. mg proteína⁻¹. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

II.2.6. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da isocitrato desidrogenase (IDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 12 mostra os efeitos do CIC, do HIV e da Leu, na concentração de 5,0 mM, sobre a atividade da IDH. Verificamos que nenhum dos metabólitos foi capaz de alterar essa atividade enzimática.

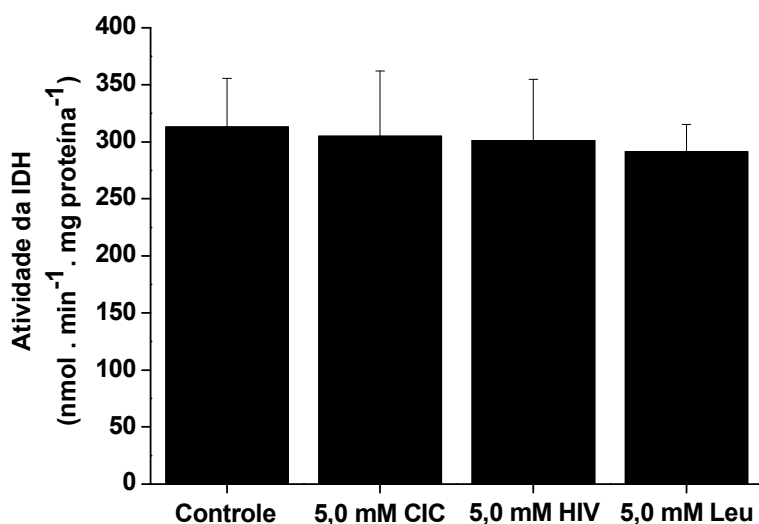


Figure 12. Efeito *in vitro* dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 6) e a atividade é expressa como $\text{nmol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

II.2.7. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 13 mostra os efeitos do CIC, do HIV e da Leu, na concentração de 5,0 mM, sobre a atividade da SDH. Verificamos que nenhum dos metabólitos estudados alterou a atividade dessa enzima.

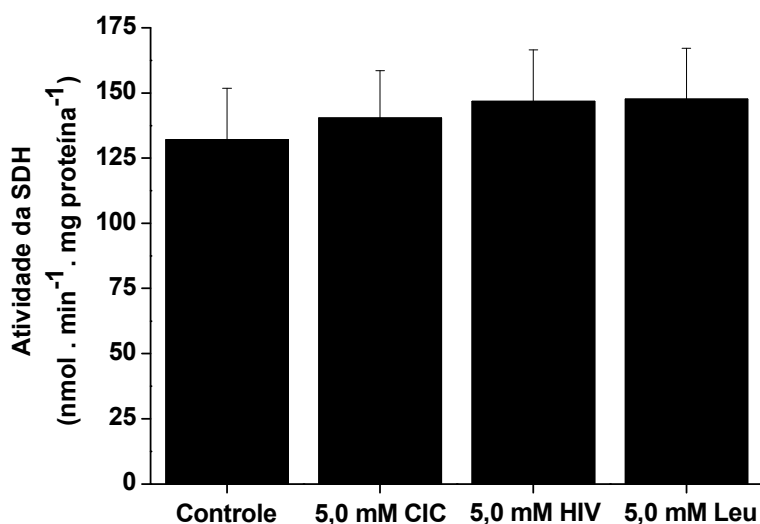


Figure 13. Efeito *in vitro* dos ácido α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens. Os valores representam média \pm desvio padrão (N = 6) e a atividade é expressa como $\text{nmol DCIP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA).

II.2.8. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre a atividade da malato desidrogenase (MDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 14 mostra os efeitos do CIC, HIV e Leu, na concentração de 5,0 mM, sobre a atividade da MDH. Verificamos que nenhum dos metabólitos foi capaz de alterar essa atividade enzimática.

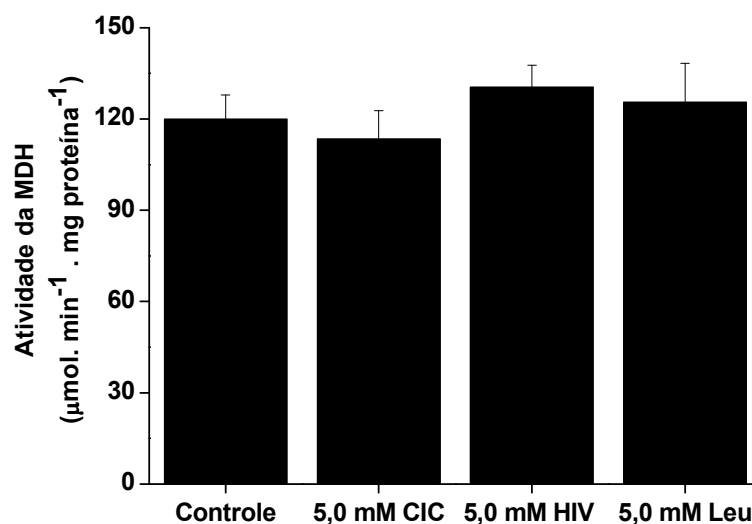


Figure 14. Efeito *in vitro* dos \u00e1cidos α -cetoisocapr\u00f3ico (CIC), α -hidroxiisoval\u00e9rico (HIV) e da leucina (Leu) na concentra\u00e7\u00e3o de 5,0 mM sobre a atividade da malato desidrogenase (MDH) em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais de c\u00e9rebro de ratos jovens. Os valores representam m\u00e9dia \pm desvio padr\u00e3o (N = 6) e a atividade \u00e9 expressa como $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$. N\u00e3o houve diferen\u00e7a significativa entre os grupos (ANOVA).

II.2.9. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 15 mostra o efeito do CIC (5,0 mM) sobre o $\Delta\Psi_m$ em mitocôndrias respirando em estado 4, utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) e α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios. Observamos que o CIC induziu uma leve redução no potencial de membrana mitocondrial quando α -cetogluturato foi o substrato respiratório, sem alterar este parâmetro com os demais substratos testados.

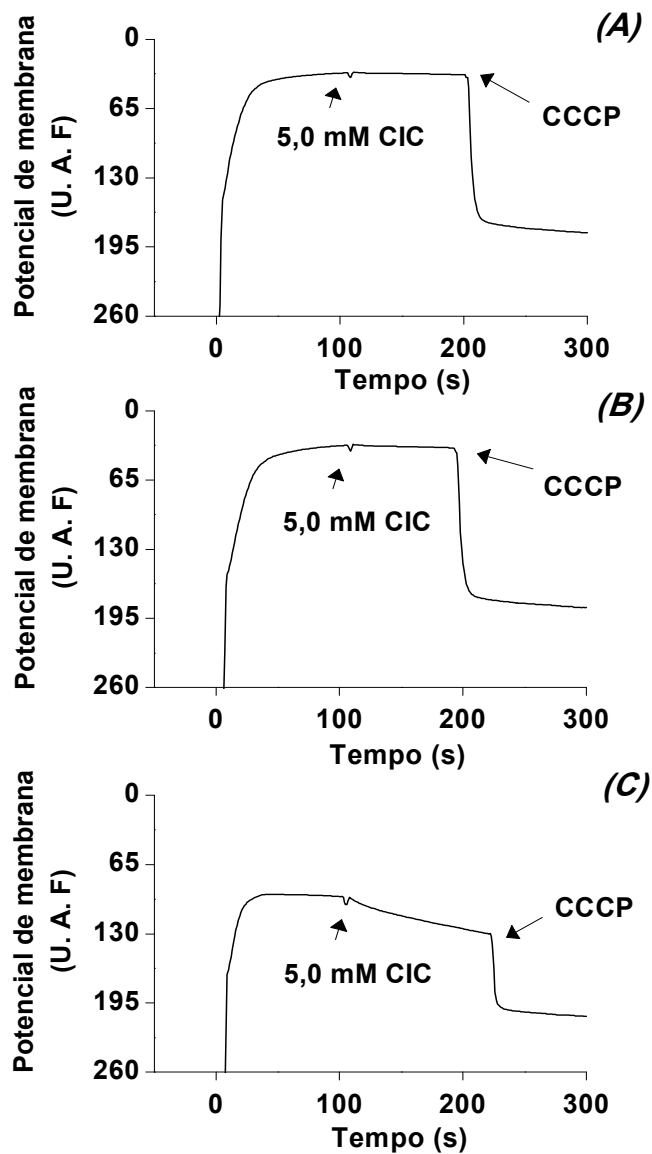


Figure 15. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios. Após cem segundos o CIC foi adicionado na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína . mL⁻¹). CCCP (1 μ M) foi adicionado no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.10. Efeito *in vitro* do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 16 mostra o efeito do HIV (5,0 mM) sobre o $\Delta\Psi_m$, em mitocôndrias respirando em estado 4, utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) e α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios. Verificamos que o HIV não alterou esse parâmetro em nenhuma das condições testadas.

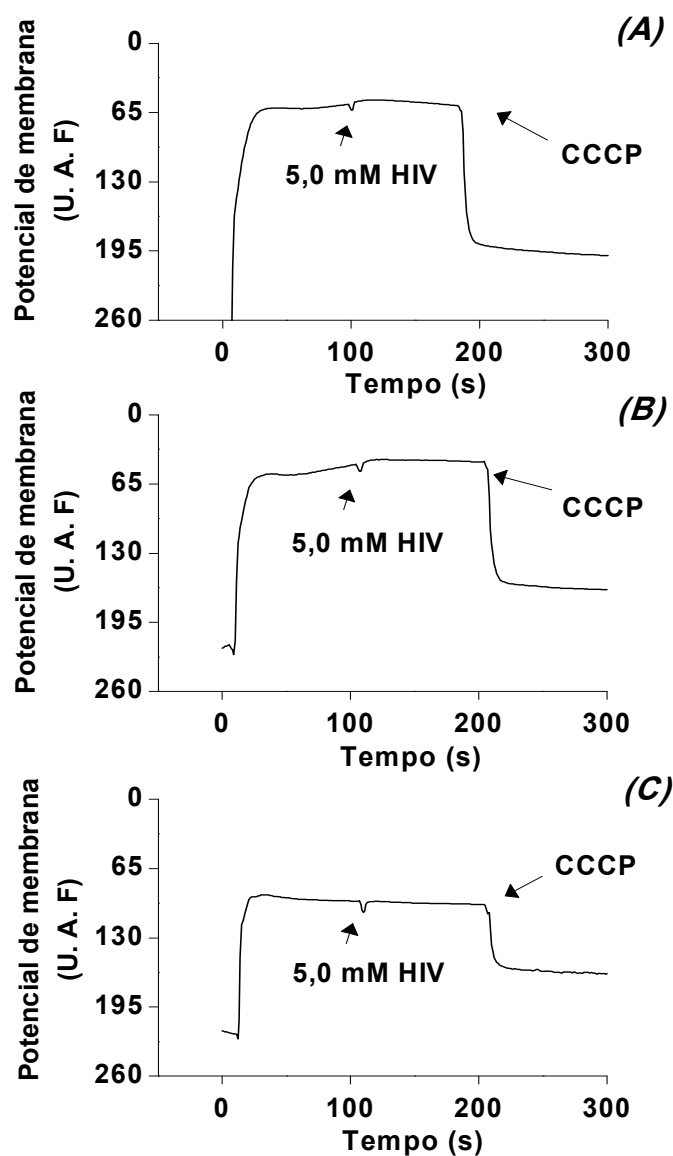


Figure 16. Efeito *in vitro* do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetoglutarato (C) como substratos respiratórios. Após cem segundos o HIV foi adicionado na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína . mL⁻¹). CCCP (1 μ M) foi adicionado no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.11. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 17 mostra o efeito da Leu (5,0 mM) sobre o $\Delta\Psi_m$, realizado com mitocôndrias respirando em estado 4, utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) e α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios. Foi verificado que a Leu provocou uma leve redução no potencial de membrana mitocondrial quando α -cetogluturato foi o substrato respiratório, sem alterar este parâmetro com os demais substratos testados.

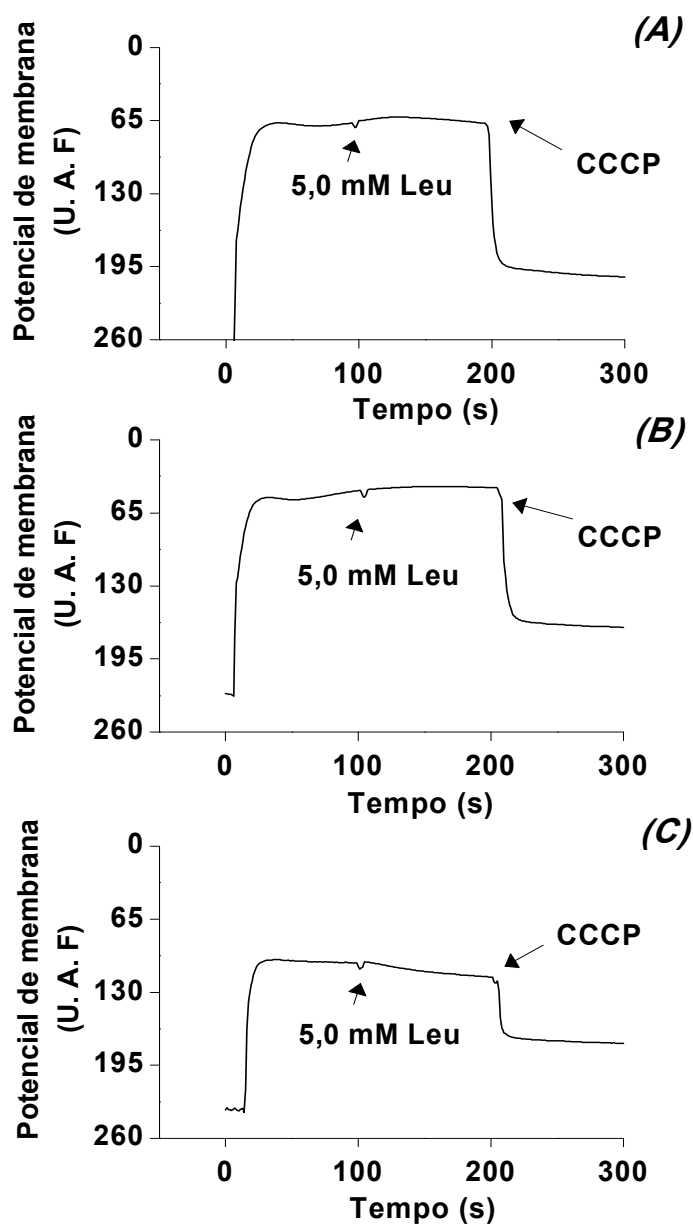


Figure 17. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios. Após cem segundos a Leu foi adicionada na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína . mL⁻¹). CCCP (1 μ M) foi adicionado no final das medições. Os traços são representativos de quarto experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.12. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 18 mostra o efeito do CIC (5,0 mM) sobre o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias respirando em estado 4 e utilizando glutamato/malato (*A*) e α -cetogluturato (*B*) como substratos respiratórios. Observamos que o CIC foi capaz de diminuir o conteúdo de NAD(P)H com ambos os substratos empregados. Por outro lado, a adição de rotenona restabeleceu completamente o conteúdo mitocondrial de NAD(P)H.

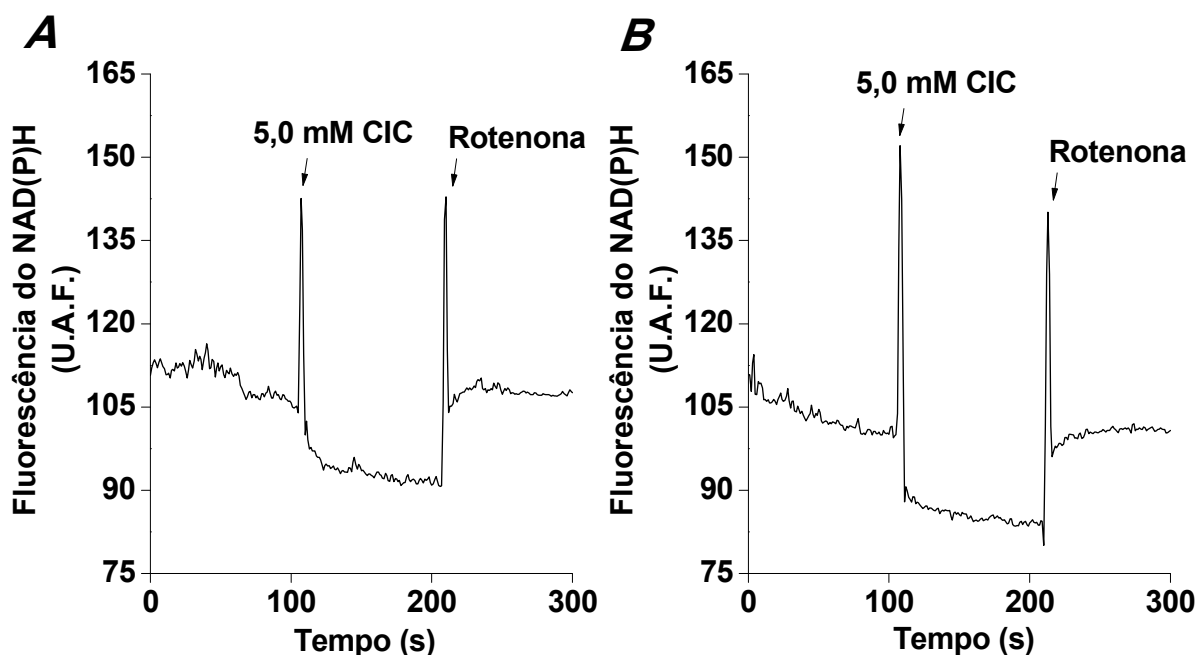


Figure 18. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetoglutarato (B) como substratos respiratórios. Após cem segundos o CIC foi adicionado na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$). Rotenona ($4 \text{ } \mu\text{M}$) foi adicionada no final das medições. Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.13. Efeito *in vitro* do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 19 mostra o efeito do HIV (5,0 mM) sobre o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias respirando em estado 4 e utilizando glutamato/malato (*A*) e α -cetogluturato (*B*) como substratos respiratórios. Observamos que o HIV não alterou o conteúdo de NAD(P)H com ambos os substratos empregados.

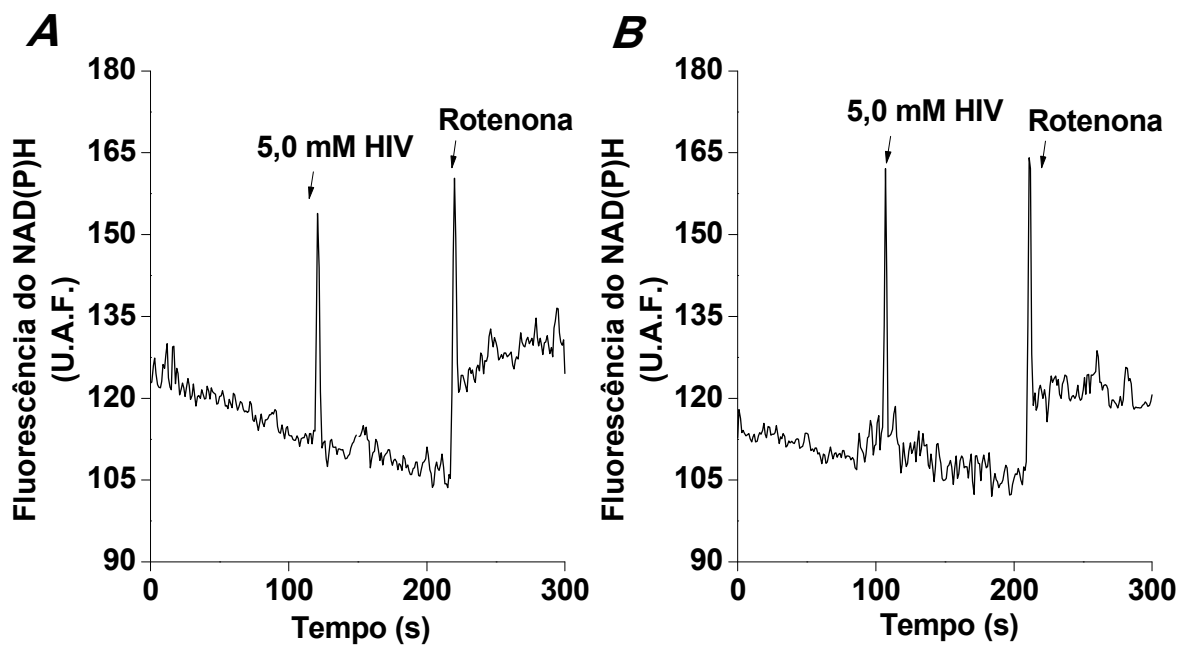


Figure 19. Efeito *in vitro* do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetoglutarato (B) como substratos respiratórios. Após cem segundos o HIV foi adicionado na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial (0,5 mg proteína \cdot mL⁻¹). Rotenona (4 μ M) foi adicionada no final das medições. Os traços são representativos de quarto experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.14. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 20 mostra o efeito da Leu (5,0 mM) sobre o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias respirando em estado 4 e utilizando glutamato/malato (*A*) e α -cetogluturato (*B*) como substratos respiratórios. Observamos que a Leu não alterou o conteúdo de NAD(P)H com ambos os substratos empregados.

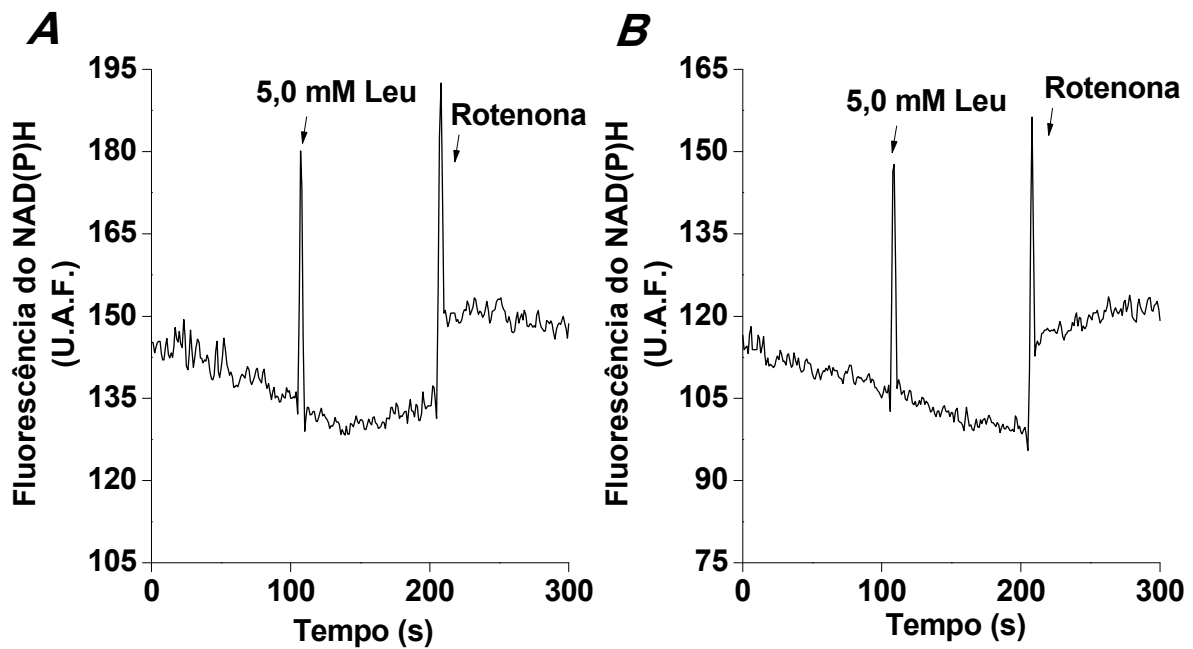


Figure 20. Efeito *in vitro* da leucina (Leu) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetogluturato (B) como substratos respiratórios. Após cem segundos a Leu foi adicionada na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$). Rotenona ($4 \text{ } \mu\text{M}$) foi adicionada no final das medições. Os traços são representativos de quarto experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

II.2.15. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), do ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) sobre o inchamento mitocondrial em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens

A figura 21 mostra o efeito do CIC, HIV e Leu, na concentração de 5,0 mM, sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias respirando em estado 4 e utilizando succinato como substrato respiratório. Foi verificado que nenhum dos metabólitos testados causou inchamento mitocondrial.

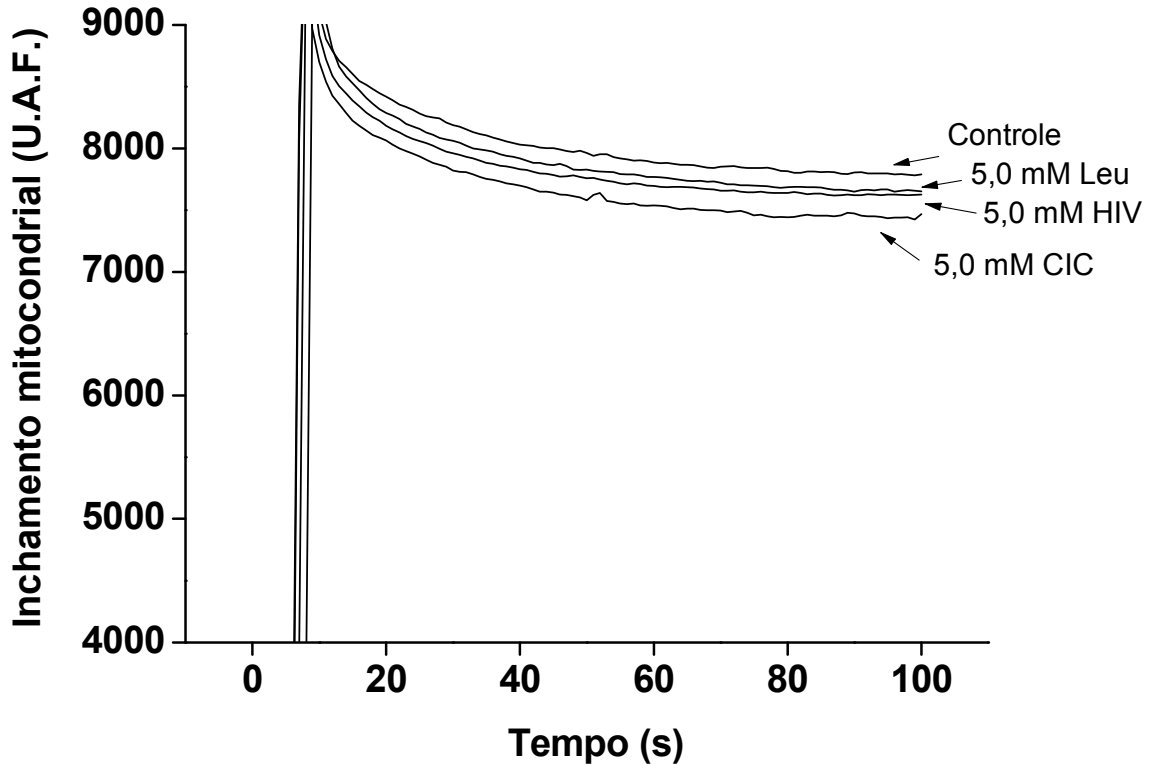


Figure 21. Efeito *in vitro* do ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e leucina (Leu) sobre o inchamento mitocondrial utilizando succinato como substrato respiratório. O CIC, o HIV ou a Leu foram adicionados na concentração de 5,0 mM ao meio de reação contendo a preparação mitocondrial ($0,5 \text{ mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$). Os traços são representativos de quatro experimentos independentes e foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.).

PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

A doença do xarope do bordo (DXB) é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência na atividade do complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (CDCCR) provocando um acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), juntamente com seus respectivos cetoácidos (CCR) e hidroxíácidos de cadeia ramificada (HCR), sendo a leucina (Leu) e os ácidos α -cetoisocapróico (CIC) e α -hidroxiiisovalérico (HIV) os metabólitos acumulados em maior concentração nos pacientes afetados por esta doença. Os pacientes apresentam sintomas predominantemente neurológicos, como letargia, hipotonia e hipertonia, convulsões e coma, além de cetose, hipoglicemia e recusa alimentar. A severidade destes sintomas varia de acordo com a forma da doença apresentada pelos pacientes, sendo a forma clássica a mais agressiva, apresentando um quadro neonatal de encefalopatia, seguido de morte em muitos casos.

Os mecanismos de neurotoxicidade dos ACR e CCR ainda são pouco conhecidos. No entanto, a Leu e o CIC parecem ser os metabólitos mais tóxicos, pois seu acúmulo durante as crises metabólicas está relacionado com o aparecimento de sintomas neurológicos severos (Shigematsu et al., 1983).

Diversos trabalhos vêm tentando explicar a toxicidade dos CCR e ACR acumulados na DXB. Neste particular, foi demonstrado que o CIC e o CIV inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizados de cérebro de rato (Tashian, em 1961), levando a uma diminuição da quantidade do ácido γ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Dodd et al, 1992). Neste contexto, foi verificado que o CIV provoca convulsões em ratos jovens quando injetado intraestriatalmente (Coitinho et al., 2001). Foi também observado que

esses CCR inibem a oxidação da glicose e a síntese de acetilcolina, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em fatias de cérebro de ratos (Gibson e Blass, 1976), bem como a oxidação e o transporte mitocondrial de piruvato, a atividade do complexo piruvato desidrogenase e a atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase (Gibson e Blass, 1976). Observou-se também que o excesso de leucina na dieta provoca uma diminuição da serotonina cerebral (Yuwiler e Geller, 1965).

Por outro lado alguns estudos demonstraram que a elevação sérica de Leu e de CIC no espaço extracelular altera as concentrações no sistema nervoso central dos aminoácidos transportados pelo transportador dos aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L) que incluem a metionina, valina, isoleucina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina, levando a uma diminuição da biossíntese cerebral de neurotransmissores como as catecolaminas e a serotonina derivados de alguns desses aminoácidos (Zielke et al, 1996; Huang et al, 1996).

Entre os vários mecanismos propostos para explicar o dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados pela DXB está a disfunção mitocondrial, levando a uma alteração no metabolismo energético. Estudos *in vitro* apontam para um efeito inibitório dos CCR sobre a produção de CO₂ e a atividade do complexo I-III (50-60 % de diminuição) da cadeia respiratória, embora não tenham sido demonstrados efeitos na liberação de lactato, utilização de glicose ou ainda na atividade dos outros complexos da cadeia respiratória. Considerando que a atividade do complexo III não foi afetada presume-se que o efeito inibitório encontrado na atividade do complexo I-III foi causado por um bloqueio na atividade do complexo I pelos CCR (Sgaravatti et al., 2003). Além disso, Ribeiro e colaboradores (2008) demonstraram que os ACR produziram um efeito inibitório *in vitro*

sobre a produção de CO₂, bem como sobre a cadeia respiratória, inibindo os complexos II-III, III e IV. Foi observado também que os ACR aumentaram a captação de glicose, sem modificar a atividade da enzima piruvato desidrogenase e de enzimas chaves do ciclo do ácido cítrico.

Com o objetivo de melhor esclarecer os mecanismos pelos quais os metabólitos que se acumulam em maior concentração na DXB (CIC, HIV e Leu) comprometem as funções mitocondriais, o presente estudo avaliou o efeito destes metabólitos sobre importantes parâmetros da bioenergética mitocondrial em preparações mitocondriais obtidas a partir de cérebro de ratos jovens.

Inicialmente, verificamos que o CIC aumentou significativamente o consumo de oxigênio no estado 4 e diminuiu a razão de controle respiratório (RCR) com todos os substratos utilizados (glutamato/malato, succinato e α -cetogluturato), sugerindo um efeito desacoplador desse composto, enquanto que Leu e HIV não alteraram esses parâmetros com os mesmos substratos.

Além disso, o CIC e a Leu, mas não o HIV, foram capazes de diminuir o consumo de oxigênio em mitocôndrias estimuladas respirando no estado 3 quando o α -cetogluturato foi utilizado como substrato. É pouco provável que essa diminuição do consumo de oxigênio esteja relacionada com uma inibição importante nos complexos da cadeia respiratória capazes de comprometer a velocidade de respiração mitocondrial, uma vez que a utilização de glutamato/malato ou succinato não afetou essa medida. Deve-se, no entanto, enfatizar que foi previamente demonstrado que o CIC e a Leu inibem a atividade dos complexos I (50%) e IV (30%) da cadeia respiratória, respectivamente, em homogeneizado de córtex cerebral de ratos (Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008). Entretanto, um

grau maior de inibição desses complexos seria necessário para que houvesse uma alteração da velocidade da respiração mitocondrial (Davey and Clark, 1996; Rossignol et al., 2003).

Por outro lado, é possível que a inibição do estado 3 causado por CIC e a Leu possam ser devidas ao bloqueio da oxidação do α -cetogluturato. Portanto, testamos o efeito do CIC, do HIV e da Leu sobre a atividade da α -cetogluturato desidrogenase (α -CGDH) e também sobre outras enzimas do ciclo do ácido cítrico. Foi verificado que o CIC provocou uma substancial inibição da α -CGDH sem modificar a atividade da citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH), succinato desidrogenase (SDH) e malato desidrogenase (MDH), o que poderia explicar a diminuição encontrada do consumo de oxigênio no estado 3 por esse metabólito quando foi utilizado α -cetogluturato como substrato. No entanto, o HIV e a Leu não alteraram nenhuma atividade enzimática investigada, sugerindo outro mecanismo para esse aminoácido envolvido na inibição do consumo de oxigênio no estado 3 quando o substrato utilizado foi α -cetogluturato. Nesse contexto, uma possibilidade seria a transaminação da Leu com α -cetogluturato através da aminotransferase de cadeia ramificada (ATCR) formando CIC e diminuindo a disponibilidade desse substrato. Enfatize-se que a forma citosólica da ATCR no cérebro corresponde a 70% da atividade total da ATCR, enquanto que a isoforma mitocondrial representa 30% dessa atividade. (Hutson, 1988; Hutson et al., 1992; Hall et al., 1993; Sweatt et al., 2004, Castellano et al., 2006).

Foi também observado que o CIC reduziu a razão ADP/O utilizando glutamato/malato ou α -cetogluturato, mas não succinato, como substrato respiratório. No entanto, o HIV e a Leu não afetaram a razão ADP/O com nenhum dos substratos testados. Esses resultados indicam uma diminuição seletiva da eficiência da fosforilação oxidativa

causada pelo CIC, necessitando um maior consumo de oxigênio para a síntese de ATP, o qual poderia ser atribuído a um efeito inibitório desse cetoácido sobre a α -CGDH e/ou sobre a inibição do complexo I (Sgaravatti et al., 2003).

Além disso, o CIC provocou uma moderada diminuição no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando α -cetogluturato, mas não glutamato/malato ou succinato, como substrato respiratório e uma redução do conteúdo mitocondrial de NAD(P)H com ambos os substratos testados, à qual pode ocorrer possivelmente pela indução da oxidação do NADH pelo CIC. O conteúdo mitocondrial de NAD(P)H foi totalmente restabelecido pelo inibidor do complexo I rotenona, o qual previne a oxidação do NADH, indicando que esses equivalentes reduzidos não foram perdidos da matriz mitocondrial na presença do CIC. Considerando que agentes desacopladores aumentam a velocidade da respiração mitocondrial (consumo de oxigênio) sob condições de estado 4, além de reduzir o conteúdo de NAD(P)H e o $\Delta\Psi_m$ (Schönfeld and Reiser, 2006; Komen et al., 2007; Schuck et al., 2009), nossos resultados sugerem que CIC se comporta como um desacoplador. Além disso, é possível que a inibição da atividade da α -CGDH induzida pelo CIC possa também estar envolvida com parte dos resultados obtidos no presente trabalho.

A Leu também induziu uma pequena diminuição no $\Delta\Psi_m$ quando α -cetogluturato, mas não glutamato/malato ou succinato, foi o substrato, apesar de não ter alterado a atividade da α -CGDH ou o conteúdo mitocondrial de NAD(P)H. Embora não saibamos no momento os mecanismos envolvidos nesse efeito, deve-se considerar a hipótese de conversão de Leu em CIC, o qual é capaz de exercer efeito semelhante na presença desse substrato. Uma redução na disponibilidade de α -cetogluturato pela transaminação com a Leu, formando glutamato e CIC, também pode ser uma possibilidade para explicar nossos

resultados. Além disso, o HIV não alterou o potencial de membrana nem o conteúdo mitocondrial de NAD(P)H com os substratos utilizados.

Analisados em seu conjunto, nossos resultados indicam que o CIC foi o composto que mais alterou os parâmetros medidos, agindo como um desacoplador da fosforilação oxidativa e como inibidor metabólico. Por outro lado, a Leu não se comportou como um agente desacoplador, mas apenas como um inibidor metabólico. Com relação aos mecanismos relacionados ao efeito desacoplador causado pelo CIC, não se pode atribuir que seja devido a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, visto que o CIC não causou inchamento mitocondrial, assim como o HIV e a Leu. No entanto, é possível que CIC se comporte da mesma maneira que outros ácidos orgânicos fracos, os quais se unem a prótons no espaço intermembrana e penetram na matriz mitocondrial, diminuindo o $\Delta\Psi_m$ (Kadenbach, 2003).

É difícil determinar a relevância fisiopatológica dos nossos resultados, visto que as concentrações cerebrais de CIC, HIV e Leu na DXB ainda não estão estabelecidas. Entretanto, deve-se notar que os efeitos observados com o CIC e a Leu sobre parâmetros da bioenergética mitocondrial em cérebro avaliados nesse trabalho ocorreram com concentrações similares (5 mM) àquelas encontradas em plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes afetados por essa doença (Shigematsu et al., 1983). Além disso, é possível que concentrações cerebrais maiores de CIC, HIV e Leu podem ser alcançadas em situações de estresse catabólico que ocorrem durante episódios de descompensação metabólica e que se caracterizam por intenso catabolismo e proteólise, como demonstrado para outros ácidos orgânicos cujas concentrações dentro das células neurais predominam acima daquelas encontradas em plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes (Hoffmann et al., 1993).

Concluindo, demonstramos pela primeira vez que o CIC se comporta como um desacoplador da fosforilação oxidativa e um inibidor metabólico reduzindo o consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial, bem como o $\Delta\Psi_m$ e o conteúdo mitocondrial de equivalentes reduzidos, além de estimular o estado 4 da respiração mitocondrial. Tais resultados apontam esse composto endógeno como a neurotoxina mais importante que se acumula na DXB, prejudicando a homeostase bioenergética mitocondrial em cérebro de ratos. Além disso, demonstramos que a Leu reduziu o $\Delta\Psi_m$ e o estado 3 quando α -cetoglutarato foi o substrato, refletindo um prejuízo ao sistema oxidativo desse substrato, sem apresentar indícios de se comportar como um agente desacoplador. Por outro lado, o HIV não causou nenhum efeito significativo sobre todos os parâmetros testados. Considerando que o estado de fosforilação do *pool* de ATP citosólico é muito sensível a pequenas mudanças no $\Delta\Psi_m$ (Nicholls, 2004), os efeitos provocados pelo CIC, seguido da Leu, podem ter consequências funestas para a homeostase energética em pacientes portadores da DXB. No caso dos presentes resultados *in vitro* serem confirmados *in vivo* em experimentos com animais e também com tecidos de pacientes afetados por essa doença, é possível especular que a disfunção mitocondrial pode contribuir, ao menos em parte, para a patogênese do dano cerebral característico desses pacientes.

III.2. CONCLUSÕES

- O CIC estimula o estado 4 da respiração mitocondrial e diminui o RCR significativamente, sem alterar o estado 3, utilizando glutamato/malato ou succinato como substratos respiratórios em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.

- O CIC estimula o estado 4 da respiração mitocondrial, diminui o RCR e inibe o estado 3 significativamente, utilizando α -cetogluturato como substrato respiratório em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.
- O CIC diminui a razão ADP/O utilizando glutamato/malato ou α -cetogluturato como substrato respiratório em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.
- O HIV não altera nenhum parâmetro respiratório testado com nenhum dos substratos respiratórios utilizados.
- A Leu inibe significativamente o estado 3 utilizando α -cetogluturato como substrato, sem alterar os demais parâmetros respiratórios. Quando as preparações mitocondriais continham glutamato/malato ou succinato, a Leu não foi capaz de alterar os parâmetros respiratórios testados.
- O CIC inibe a α -CGDH, sem alterar as outras enzimas do ciclo do ácido cítrico, enquanto que o HIV e a Leu não alteram nenhuma atividade enzimática deste ciclo, em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.
- O CIC e a Leu provocam uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial utilizando α -cetogluturato como substrato respiratório, enquanto que o HIV não altera esse parâmetro com nenhum dos substratos testados, em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.

- O CIC reduz o conteúdo de NAD(P)H utilizando glutamato/malato ou α -cetogluturato em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens, enquanto que o HIV e a Leu não modificam esse parâmetro com os substratos utilizados.
- Nenhum dos metabólitos testados foi capaz de induzir inchamento mitocondrial em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos jovens.
- Os resultados acima indicam que o CIC, seguido da Leu, provoca um distúrbio na homeostase mitocondrial em cérebro de ratos jovens.

III.3. PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito do CIC, HIV e Leu sobre parâmetros da função mitocondrial em estudos *ex vivo*.
- Verificar o efeito dos outros metabólitos acumulados na DXB sobre parâmetros da função mitocondrial em estudos *in vitro* e *ex vivo*.
- Verificar o efeito dos metabólitos acumulados na DXB sobre a viabilidade de astrócitos e neurônios em cultura.
- Verificar o efeito dos metabólitos acumulados na DXB sobre parâmetros da função mitocondrial em astrócitos e neurônios cultivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, R.H., Frey, P.A., Jenks, W.P. *Biochemistry*. London: Jones and Bartlett, p. 603-632, 1992.

Akerman, K.E., Wikström, M.K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68:191-197, 1976.

Araújo, P., Wassermann, G.F., Tallini, K., Furlanetto, V., Vargas, C.R., Wannmacher, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem Int* 38:529-537, 2001.

Beal, M.F. Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp* 287:183-192, 2007.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.

Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Dev Neurosci* 21:327-332, 2003.

Cadenas, E., Davies, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med* 29:222-230, 2000.

Castellano, S., Macchi, F., Scali, M., Huang, J.Z., Bozzi, Y. Cytosolic branched chain aminotransferase (BCATc) mRNA is up-regulated in restricted brain areas of BDNF transgenic mice. *Brain Res* 1108:12-18, 2006.

Chuang, D.T. Maple syrup urine disease: it has come a long way. *J Pediatr* 132:17-23, 1998.

Chuang, D.T., Shih, V.E. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., editores. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8 ed. New York: McGraw-Hill, New York, pp. 1971-2001, 2001.

Coitinho, A.S., de Mello, C.F., Lima, T.T., de Bastiani, J., Figuera, M.R., Wajner, M. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Res* 894:68-73, 2001.

Cook, K.G., Lawson, R., Yeaman, S.J. Multi-site phosphorylation of bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 157:59-62, 1983.

Cook, K.G., Lawson, R., Yeaman, S.J., Aitken, A. Amino acid sequence at the major phosphorylation site on bovine kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 164:47-50, 1983a.

Couéé, I., Tipton, K.F. Activation of glutamate dehydrogenase by L-leucine. *Biochim Biophys Acta* 995:97-101, 1989.

Danner, D.J., Lemmon, S.K., Besharse, J.C., Elsas, L.J. Purification and characterization of branched chain α -ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. *J Biol Chem* 254:5522-5526, 1979.

Danner, D.J., Elsas, L.J. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., editores. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6 ed. New York: McGraw-Hill, p. 671-692, 1989.

Davey, G.P., Clark, J.B. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation

in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 66:1617-1624, 1996.

Del Rio, R.M. Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC. Madrid, 1962.

Dodd, P.R., Williams, S.H., Gundlach, A.L., Harper, P.A.W., Healy, P.J., Dennis, J.A., Johnston, G.A.R. Glutamate and γ -aminobutyric acid neurotransmitter systems in the acute phase of maple syrup urine disease and citrullinemia encephalopathies in newborn calves. *J Neurochem* 59:582-590, 1992.

Eisenstein, R.S., Hoganson, G., Miller, R.H., Harper, A.E. Altered phosphorylation state of branched-chain acyltransferase deficient human fibroblast cell line. *J Inher Metab Dis* 14:37-44, 1991.

Erecinska, M., Nelson, D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 54:1335-1343, 1990.

Estabrook, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol* 10:41-47, 1967.

Ferreira, G.C., Tonin, A., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Ceolato, P.C., Latini, A., Perry, M.L., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Vargas, C.R., Wajner, M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. *Int J Dev Neurosci* 25:391-398, 2007.

Fischer, M.H., Gerritsen, T. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics* 48:795-801, 1971.

Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, M., Sengers, R.C., Janssen, A.J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36, 1985.

Fontella, F.U., Gasse, E., Pulronik, V., Wannmacher, C.M., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 17:47-54, 2002.

Funchal, C., de Lima Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Dall Bello Pessuto, F., de Almeida, L.M., Tchernin Wofchuk, S., Wajner, M., Pessoa Pureur, R. Alpha-Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Brain Res Dev Brain Res* 139:267-276, 2002.

Funchal, C., Rosa, A.M., Wajner, M., Wofchuck, S., Pureur, R.P. Reduction of glutamate uptake into cerebral cortex of developing rats by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 29:747-753, 2004.

Funchal, C., Dall Bello Pessutto, F., de Almeida, L.M., de Lima Pelaez, P., Loureiro, S.O., Vivian, L., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. *J Neurol Sci* 217:17-24, 2004a.

Gibson, G.E., Blass, J.P. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. *J Neurochem* 26:1073-1078, 1976.

Gil, J.M., Rego, A.C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27:2803-2820, 2008.

Gonzales-Rios, M.D.C., Chuang, D.T., Cox, R.P., Schmidt, K., Knopf, K., Packman, S. A distinct variant of intermediate maple syrup urine disease. *Clin Genet* 27:153-159, 1985.

Hall, T.R., Wallin, R., Reinhart, G.D., Hutson, S.M. Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme.

J Biol Chem 268:3092–3098, 1993.

Han, D., Williams, E., Cadenas, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353:411-416, 2001.

Hoffmann, G.F., Meier-Augenstein, W., Stockler, S., Surtees, R., Rating, D., Nyhan, W.L. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis* 16:648–669, 1993.

Huang, Y., Zielke, H.R., Tildon, J.T., Zielke, C.L., Baab, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: leucine infusion. *Dev Neurosci* 18:415-419, 1996.

Hutson, S.M. Subcellular distribution of branched-chain aminotransferase activity in rat tissues. *J Nutr* 118:1475–1481, 1988.

Hutson, S.M., Wallin, R., Hall, T.R. Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rat tissues. *J Biol Chem* 267:15681–15686, 1992.

Jan, W., Zimmerman, R.A., Wang, Z.J., Berry, G.T., Kaplan, P.B., Kaye, E.M. MR diffusion imaging and MR spectroscopy of maple syrup urine disease during acute metabolic decompensation. *Neuroradiology* 45:393-399, 2003.

Jouvet, P., Kozma, M., Mehmet, H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann N Y Acad Sci* 926:116-121, 2000.

Kadenbach, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1604:77-94, 2003.

Kitto, G.B. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol* 13:106–116, 1969.

Kleijer, W.J., Worsman, D., Mancini, G.M., Fois, A., Boue, J. First-trimester diagnosis of maple syrup urine disease on intact chorionic villi. *N Engl J Med* 313:1608, 1985.

Komen, J.C., Distelmaier, F., Koopman, W.J., Wanders, R.J., Smeitink, J., Willems, P.H. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci* 64:3271-3281, 2007.

Kowaltowski, A.J., Cosso, R.G., Campos, C.B., Fiskum, G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *J Biol Chem* 277:42802-42807, 2002.

Latini, A., da Silva, C.G., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Scussiato, K., Sarkis, J.J., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199, 2005.

Lau, K.S., Philips, C.E., Randle, P.J. Multi-site phosphorylation in ox-kidney branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 160:149-152, 1983.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157, 1996.

Mackenzie, D.Y., Woolf, L.I. Maple syrup urine disease; an inborn error of the metabolism of valine, leucine, and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br Med J* 1:90-91, 1959.

Mello, C.F., Feksa, L., Brusque, A.M., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Chronic early leucine administration induces behavioral deficits in rats. *Life Sci* 65:747-755, 1999.

Menkes, J.H., Hurst, P.L., Craig, J.M. A new syndrome: Progressive familial

infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462-467, 1954.

Menkes, J.H. Maple syrup urine disease. Isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* 23:348-353, 1959.

Mirandola, S.R., Melo, D.R., Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Wajner, M., Castilho, R.F. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 31:44-54, 2008.

Moshal, K.S., Metreveli, N., Frank, I., Tyagi, S.C. Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. *Curr Vasc Pharmacol* 6:84-92, 2008.

Muller, H., Bickel, H., Feist, D., Lutz, P. Maple syrup urine disease with an intermittent relatively benign course. *Dtsch Med Wochenschr* 96:1552-1557, 1971.

Nelson, D.L., Cox, M.M. Lehninger, Principles of biochemistry, 3 ed. New York: Worth Publishers, p. 623-721, 2000.

Nicholls, D.G., Akerman, K.E.O. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 683:57-88, 1982.

Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. Bioenergetics, 4 ed. London: Academic Press, p. 57-87, 2001.

Nicholls, D.G. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3:35-40, 2004.

Nobukuni, Y., Mitsubuchi, H., Ohta, K., Akaboshi, I., Indo, Y., Endo, F., Matsuda, I. Molecular diagnosis of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 15:827-833, 1992.

Panten, U., Krigstein, W.V., Poser, W., Schonborn, J., Hasselblatt, A. Effects of L-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insuline secretion and metabolism of isolated

pancreatic islets. FEBS Lett 20:225-228, 1972.

Parrella, T., Surrey, A., Iolascon, A., Sartore, M., Heidenreich, R., Diamond, G., Ponzzone, A., Guardamagna, O., Burlina, A.B., Cerone, R., Parini, R., Dionisi-Vici, C., Rappaport, E., Fortina, P. Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in italian patients. J Inherit Metab Dis 17:652-660, 1994.

Paxton, R., Kuntz, M., Harris, R.A. Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and rabbit liver, kidney, heart, brain and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 244:187-201, 1986.

Peinemann, F., Danner, D.J. Maple syrup urine disease 1954-1993. J Inherit Metab Dis 17:3-15, 1994.

Pessoa-Pureur, R., Funchal, C., de Lima Pelaez, C., Vivian, L., Oliveira Loureiro, S., de Freitas Miranda, R.; Wajner, M. Effect of the branched-chain alpha-ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. Metab Brain Dis 17:65-75, 2002.

Pilla, C., Cardozo, R.F., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T., Wajner, M., Wannmacher, C.M. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. Neurochem Res 28:675-679, 2003.

Plaut, G.W.E. Isocitrate dehydrogenase from bovine heart. In: Lowenstein, J.M. Methods in enzymology. ed. Academic Press, New York, pp. 34-42, 1969.

Reed, L.J., Hackert, M.L. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. J Biol Chem 265:8971-8974, 1990.

Reddy, P.H., Beal, M.F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic

damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45-53, 2008.

Reis, M., Farage, M., Wolosker, H. Chloride-dependent inhibition of vesicular glutamate uptake by alpha-keto acids accumulated in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1475:114-118, 2000.

Reis de Assis, D., Maria, R. de C., Borba Rosa, R., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A., da Costa Ferreira, G., Dutra-Filho, C.S., Terezinha de Souza Wyse, A., Duval Wannmacher, C.M., Santos Perry, M.L., Wajner, M. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Res* 1030:141-151, 2004.

Ribeiro, C.A., Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., Grando, V., Schmidt, A.L., Ferreira, G.C., Perry, M.L., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114-24, 2008.

Rogers, Q.R., Spolter, P.D., Harper, A.E. Effect of leucine-isoleucine antagonism on plasma amino acid pattern of rats. *Arch Biochem Biophys* 97:497-504, 1962.

Rosenthal, R.E., Hamud, F., Fiskum, G., Varghese, P.J., Sharpe, S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:752-758, 1987.

Rosignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.P., Letellier, T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370:751-762, 2003.

Sasaki, S., Horie, Y., Iwata, M. Mitochondrial alterations in dorsal root ganglion cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 114:633-639, 2007.

Schadewaldt, P.L., Hammen, H.W., Dalle-Feste, C., Wendel, U. On the mechanism

of L-alloisoleucine formation: studies on a healthy subject and in fibroblasts from normals and patients with maple syrup urine disease *J Inher Metab Dis* 13:137-150, 1990.

Schadewaldt, P.L., Wendel, U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr* 156:62-66, 1997.

Schonberger, S., Schweiger, B., Schwahn, B., Schwarz, M., Wendel, U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab* 82:69-75, 2004.

Schönfeld, P., Reiser, G. Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem* 281:7136-7142, 2006.

Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Wajner, M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res* 27:1633-1639, 2002.

Schuck, P.F., Ferreira, G. da C., Tonin, A.M., Viegas, C.M., Busanello, E.N., Moura, A.P., Zanatta, A., Klamt, F., Wajner, M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res* 1296:117-126, 2009.

Sriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., editores. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8 ed. New York: McGraw-Hill Inc, p. 3-45, 2001.

Sgaravatti, A.M., Rosa, R.B., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta* 1639:232-238, 2003.

Shigematsu, Y., Kikuchi, K., Momoi, T., Sudo, M., Kikawa, Y., Nosaka, K.,

Kuriyama, M., Haruki, S., Sanada, K., Hamano, N., Suzuki, Y. Organic acids and branched-chain amino acids in body fluids before and after multiple exchange transfusions in maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 6:183-189, 1983.

Smith, C.M., Marks, A.D., Lieberman, M.A., editores. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 2 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.

Snyderman, S.E., Norton, P.M., Roitman, E., Holt, L.E.Jr. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics* 34:454-472, 1964.

Srere, P.A., 1969. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13:3-11, 1969.

Sweatt, A.J., Garcia-Espinosa, M.A., Wallin, R., Hutson, S.M. Branched-chain amino acids and neurotransmitter metabolism: expression of cytosolic branched-chain aminotransferase (BCATc) in the cerebellum and hippocampus. *J Comp Neurol* 477:360-370, 2004.

Takamura, A., Higaki, K., Kajimaki, K., Otsuka, S., Ninomiya, H., Matsuda, J., Ohno, K., Suzuki, Y., Nanba, E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem. Biophys Res Commun* 367:616-622, 2008.

Tanaka, K., Rosenberg, L.E. Disorders of branched-chain amino acid and organic acid metabolism. In: Stanbury, S.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., editors. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5 ed. McGraw-Hill, New York, pp. 440-473, 1983.

Tashian, R.E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. *Metabolism* 10:393-402, 1961.

Tavares, R.G., Santos, C.E., Tasca, C.I., Wajner, M., Souza, D.O., Dutra-Filho, C.S. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites

accumulating in maple syrup urine disease. *J Neurol Sci* 181:44-49, 2000.

Treacy, E., Clow, C.L., Reade, T.R., Chitayat, D., Mamer, O.A., Scriver, C.R. Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis* 15:121-135, 1992.

Tretter, L., Adam-Vizi, V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci* 20:8972-8979, 2000.

Vasques, V. C., Brinco, F., Wajner, M. Intrahippocampal administration of the branched-chain α -hydroxy acids accumulating in maple syrup urine disease compromises rat performance in aversive and non-aversive behavioral tasks. *J Neurol Sci* 232:11-21, 2005.

Viegas, C.M., da Costa Ferreira, G., Schuck, P.F., Tonin, A.M., Zanatta, A., de Souza Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:293-299, 2008.

Vila, M., Ramonet, D., Perier, C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. *J Neurochem* 107:317-328, 2008.

Wendel, U., Langenbeck, U., Lombeck, I., Bremer, H.J. Maple syrup urine disease – therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139:172-175, 1982.

Westall, R.G., Dancis, J., Miller, S. Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child* 94:571-572, 1957.

Yeaman, S.J. The mammalian 2-oxo acid dehydrogenases: a complex family. *Trends Biochem Sci* 11:293-296, 1986.

Yeaman, S.J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 257:625-632, 1989.

Yielding, K.L., Tomkins, G.M. An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47:983-990, 1961.

Yudkoff, M., Nissim, I., Daikhin, Y., Lin, Z.P., Nelson, D., Pleasure, D., Erecinska, M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. *Dev Neurosci* 15:343-350, 1993.

Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Pleasure, D., Stern, J., Nissim, I. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha-ketoisocaproic acid. *J Neurochem* 63:1508-1515, 1994.

Yuwiler, A., Geller, E. Serotonin depletion by dietary leucine. *Nature* 208:83-84, 1965.

Zielke, H.R., Huang, Y., Tildon, J.T., Zielke, C.L., Baab, P.J. Elevation of amino acids in the interstitial space of the rat brain following infusion of large neutral amino and keto acids by microdialysis: alpha-ketoisocaproate infusion. *Dev Neurosci* 18:420-425, 1996.

Zielke, H.R., Huang, Y., Baab, P.J., Collins, R.M., Zielke, C.L., Tildon, J.T. Effect of α -ketoisocaproate and leucine on the *in vivo* oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem Res* 22:1159-1164, 1997.

Zugno, A.I., Scherer, E.B., Schuck, P.F., Oliveira, D.L., Wofchuk, S., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T. Intrastriatal administration of guanidinoacetate inhibits Na⁺, K⁺-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis* 21:41-50, 2006.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina.....	8
Figura 2 - Complexo desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada.....	11
Figura 3 - Rotas metabólicas dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina.....	13
Figura 4. Lançadeira do malato (A) e lançadeira do glicerol-3-P (B).....	26
Figura 5. Estados da respiração mitocondrial.....	29
Figura 6. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos.....	41
Figura 7. Efeito <i>in vitro</i> do α -hidroxiisovalérico (HIV) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos.....	43
Figura 8. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre o consumo de oxigênio em mitocôndrias não estimuladas (estado 4) (A) e estimuladas por ADP (estado 3) (B) e sobre as razões de controle respiratório (RCR) (C) e ADP/O (D), utilizando glutamato/malato, succinato ou α -cetogluturato como substratos.....	45
Figura 9. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima α -cetogluturato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	47
Figura 10. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre a atividade da α -	

cetogluturato desidrogenase (α -CGDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	48
Figura 11. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima citrato sintase (CS) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	49
Figura 12. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	50
Figura 13. Efeito <i>in vitro</i> dos ácido α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	51
Figura 14. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos α -cetoisocapróico (CIC), α -hidroxiiisovalérico (HIV) e da leucina (Leu) na concentração de 5,0 mM sobre a atividade da malato desidrogenase (MDH) em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.....	52
Figura 15. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios.....	54
Figura 16. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -hidroxiiisovalérico (HIV) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios.....	56
Figura 17. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre o potencial de membrana mitocondrial utilizando glutamato/malato (A), succinato (B) ou α -cetogluturato (C) como substratos respiratórios.....	58
Figura 18. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetogluturato (B) como substratos respiratórios.....	60
Figura 19. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -hidroxiiisolvalérico (HIV) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetogluturato (B) como substratos respiratórios.....	62

Figura 20. Efeito <i>in vitro</i> da leucina (Leu) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais utilizando glutamato/malato (A) e α -cetoglutarato (B) como substratos respiratórios.....	64
Figura 21. Efeito <i>in vitro</i> do ácido α -cetoisocapróico (CIC), ácido α -hidroxiisovalérico (HIV) e leucina (Leu) sobre o inchamento mitocondrial utilizando succinato como substrato respiratório.....	66