

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

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAESTRIATAL DE LISINA
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
METABOLISMO ENERGÉTICO EM ESTRIADO DE RATOS
JOVENS

Bianca Seminotti

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, 2011

*“Aqueles não eram os mesmos olhos com os quais observara aquela vista pela última vez,
e o cérebro que interpretava as imagens que seus olhos montavam também
não era o mesmo cérebro. Nenhuma cirurgia envolvida, apenas
a desarticulação contínua da experiência.”*

(Douglas Adams, “Até mais, e obrigada pelos peixes!”)

*À Deus,
Aquele que é poderoso para fazer
infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos.
(Efésios 3.20)*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica, por fornecerem as condições para a realização deste trabalho, e aos professores e funcionários dessa instituição, por todo o suporte necessário.

Ao meu orientador professor Moacir, pela experiência e conhecimentos compartilhados, além do carinho e incentivo constante.

Aos professores do grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Ângela, Clóvis e Dutra, pela convivência agradável e pela ajuda sempre que necessária.

Ao Gui, insubstituível, pela amizade, pela paciência, pelo carinho, pela preocupação, pela sinceridade, e por tudo que me ensinou.

Ao Alexandre, pelo companheirismo, pela amizade e pelas mais diversas conversas, desde investimentos até batalhas históricas.

À Carol, pelo convívio diário, incluindo almoços, sábados e domingos, pela amizade, e pela constante ajuda, sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

À Ânge e à Lisi, pela companhia, pela prontidão em ajudar sempre que precisei e pela amizade.

Aos bolsistas Mateus e Clarissa, pelo interesse e pela ajuda.

Aos colegas de laboratório, Anelise, César, Carolina Viegas, Alana, Estela, Mateus, Cris, Fernanda e Luciana, pela competência e por tornarem o trabalho muito mais divertido.

Aos que passaram pelo laboratório, Rafa, Lali, Alexandre Solano, Anna Laura, Lucila, Ana Paula, Doda, Josué, Paula, Gus, Vanessa, Scussi, Karina e Pati, pela ótima companhia que sempre foram e pelas marcas que deixaram.

Aos meus mais antigos e preciosos amigos, por se importarem, por lembrarem de mim em suas orações e por tudo que aprendi durante o tempo em que estivemos perto. Sinto saudades.

Aos grandes amigos da faculdade, Dudu, Biel, Maurício, Lari e Linda, por se tornarem tão especiais e importantes ao longo do tempo.

À Martha, amiga única e mais que especial, por continuar sendo um porto seguro (mesmo longe...).

Ao Cláudio, meu amor e amigo, pela dedicação, companheirismo, risadas e por topar continuar carregando a mala de lâmpadas fluorescentes com alguns quilos a mais.

À minha família, pelo amparo, pelo carinho e dedicação.

Ao Pablo, meu irmão querido e artista, por realmente ser paciente comigo, pelo carinho, e por me fazer gargalhar nos momentos mais inesperados.

Aos meus pais, minha saxofonista e meu gaitero prediletos, exemplos de dedicação, pelo amor, educação, presença constante, confiança e pelo abrigo em cada momento da minha vida.

À Deus, pela minha vida, pelas bênçãos, por permitir a presença de pessoas incríveis no meu caminho, por ser meu refúgio, minha fortaleza, fonte de segurança e pelo colo de Pai.

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 da lisina.....	7
I.1.2.1. Via da sacaropina	8
I.1.2.2. Via do ácido pipercolico.....	9
I.1.3. Aminoacidopatias.....	10
I.1.4. Erros inatos do metabolismo da lisina.....	11
I.1.4.1. Etiologia e achados laboratoriais.....	11
I.1.4.2. Manifestações clínicas e neuropatológicas.....	13
I.1.4.3. Diagnóstico e tratamento.....	13
I.1.5. Metabolismo energético cerebral.....	14
I.1.5.1 Creatina quinase	15
I.1.5.2. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	17
I.1.6. Radicais livres.....	19
I.1.7. Defesas antioxidantes.....	20
I.1.8. Estresse oxidativo.....	21
I.1.9. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres	22
I.1.9.1. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo.....	23

I.1.9.2. Estresse oxidativo e aminoacidopatias.....	24
I.2. OBJETIVOS.....	26
I.2.1. Objetivo geral.....	26
I.2.2. Objetivos específicos.....	26
PARTE II.....	28
II.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
II.1.1. Animais de experimentação.....	29
II.1.2. Reagentes.....	29
II.1.3. Equipamentos e outros materiais.....	29
II.1.4. Procedimento cirúrgico	30
II.1.4.1. Anestesia	30
II.1.4.2. Coordenadas do estriado	30
II.1.4.3. Craniotomia e injeção de lisina.....	31
II.1.5. Sacrifício dos animais e isolamento do estriado.....	32
II.1.6. Preparação do tecido.....	32
II.1.6.1. Atividade da creatina quinase (CK)	32
II.1.6.2. Atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	32
II.1.6.3. Parâmetros de estresse oxidativo	33
II.1.7. Avaliação de parâmetros de metabolismo energético	33
II.1.7.1. Produção de ¹⁴ CO ₂ a partir de [1- ¹⁴ C]acetato.....	33
II.1.7.2. Determinação da atividade da creatina quinase (CK).....	34
II.1.7.3. Determinação da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	34
II.1.8. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo.....	35

II.1.8.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	35
II.1.8.2. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	35
II.1.8.3. Medida de grupamentos sulfidrilas.....	36
II.1.8.4. Medida da atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	36
II.1.8.5. Medida da atividade da catalase (CAT).....	37
II.1.8.6. Medida da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	37
II.1.8.7. Medida da atividade da Glicose – 6- fosfato desidrogenase(G6PD).....	38
II.1.9. Dosagem de proteínas.....	38
II.1.10. Análise estatística	38
II.2. RESULTADOS.....	40
II.2.1. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a produção de ¹⁴ CO ₂ a partir de [1- ¹⁴ C] acetato (atividade do ciclo do ácido cítrico, CAC) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	40
II.2.2. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade da enzima creatina quinase em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	41
II.2.3. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ ATPase de membranas plasmáticas sinápticas de estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	42
II.2.4. Efeito da melatonina (A), combinação de α-tocoferol com ascorbato (B), creatina (C) e N-acetilcisteína (D) sobre a diminuição da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase causada pela administração intraestriatal de lisina	43
II.2.5. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a medida de	

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	45
II.2.6. Efeito da melatonina (A), combinação do α -tocoferol com ascorbato (B) e creatina (C) sobre a aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela administração intraestriatal de lisina.....	46
II.2.7. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre os níveis de glutaciona reduzida (GSH) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	48
II.2.8. Efeito da melatonina (A), combinação do α -tocoferol com ascorbato (B) e creatina (C) sobre a diminuição dos níveis de glutaciona reduzida (GSH) causada pela administração intraestriatal de lisina.....	49
II.2.9. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre o conteúdo de grupamento sulfidrilas em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	51
II.2.10. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase, catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	51
PARTE III.....	53
III.1. DISCUSSÃO.....	54
III.2. CONCLUSÕES.....	61
III.3. PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS.....	80
LISTA DE FIGURAS.....	80

PARTE I

RESUMO

A lisina (Lis) é degradada principalmente na mitocôndria através das atividades lisina-cetoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase da enzima bifuncional α -aminoaldéido sintase (SAS). A transaminação do grupo amino ao α -cetoglutarato produz o intermediário sacaropina que é posteriormente convertida a acetil-CoA, entrando no ciclo do ácido cítrico. A Lis também pode ser degradada por uma via alternativa nos peroxissomos, liberando ácido pipecólico. O acúmulo de Lis em tecidos e líquidos biológicos é o principal achado bioquímico de pacientes acometidos pela hiperlisinemia familiar (HF) e por outras doenças metabólicas caracterizadas clinicamente por disfunção neurológica com retardo mental de grau variável. Estudos recentes mostraram que a Lis induz estresse oxidativo e disfunção energética *in vitro* em córtex cerebral de ratos, indicando uma ação neurotóxica para esse aminoácido. O objetivo do presente estudo foi investigar se os efeitos *in vitro* da Lis poderiam ser reproduzidos *in vivo*. Assim, estudou-se os efeitos da administração intraestritatal aguda de Lis (4 μ mol) sobre parâmetros de metabolismo energético e estresse oxidativo em estriado de ratos jovens. Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com melatonina, combinação de α -tocoferol e ácido ascórbico, creatina ou N-acetilcisteína por 3 dias, com uma única injeção diária, seguida da injeção intraestriatal de Lis. Animais controle receberam o mesmo volume de uma solução salina. Os ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia 30 min, 2 ou 12 h após a injeção intraestriatal de Lis ou NaCl e o estriado foi dissecado e homogeneizado. Os resultados mostram que a injeção *in vivo* de Lis não alterou a função do ciclo do ácido cítrico (produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato) e a atividade da creatina quinase. Em contraste, o aminoácido inibiu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em estriado 2 e 12 h após a injeção. Além disso, a Lis induziu lipoperoxidação, determinada pelo aumento significativo dos níveis das substâncias reativas ao ácido-tiobarbitúrico (TBA-RS), e diminuiu as concentrações de glutatona reduzida (GSH) 30 min e 2 h após a injeção. Os antioxidantes melatonina e a combinação de α -tocoferol e ácido ascórbico preveniram esses efeitos. Também verificamos que a Lis inibiu a atividade da glutatona peroxidase 12 h após a injeção, sem alterar as atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase. Considerando que a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e o dano oxidativo estão associados a neurodegeneração, pode-se presumir que esses efeitos deletérios causados pela Lis possam estar relacionados às manifestações neurológicas encontradas em pacientes portadores de doenças caracterizadas pelo acúmulo desse aminoácido.

ABSTRACT

Lysine (Lys) is mainly degraded in the mitochondria through lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities of the bifunctional enzyme α -amino adipic semialdehyde synthase (SAS). The transamination of the amino group to α -ketoglutarate leads to the formation of saccharopine, which is converted to acetyl-CoA and enters the citric acid cycle. Lys can be also degraded by an alternative pathway in the peroxisomes to release pipercolic acid. Lys accumulation in tissues and biological fluids is the biochemical hallmark of patients affected by familial hyperlysinemia (FH) and other inherited metabolic disorders. Recent studies have shown that Lys induces oxidative stress and energy dysfunction *in vitro* in rat cerebral cortex, suggesting that Lys may be neurotoxic. Therefore, the present study investigated the effects of acute intrastriatal administration of Lys on parameters of energy metabolism and oxidative stress in striatum of young rats. In some experiments, animals were pre-treated intraperitoneally with melatonin, the combination of α -tocopherol and ascorbic acid or creatine for 3 days, one injection per day, after which the animals received the intrastriatal injection of Lys. Control animals received the same volumes of saline solution. Animals were sacrificed by decapitation without anesthesia 30 min, 2 or 12 h after intrastriatal injection of either Lys or NaCl and the striatum was dissected and homogenized. We verified that Lys *in vivo* injection did not change the citric acid cycle function ($^{14}\text{CO}_2$ production from [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetate) and creatine kinase activity. In contrast, the amino acid significantly inhibited Na^+,K^+ -ATPase activity in striatum prepared 2 and 12 h after injection. Moreover, Lys induced lipid peroxidation, as detected by a significant increase of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), and diminished the concentrations of reduced glutathione (GSH) 30 min and 2 h after injection. The antioxidants melatonin and the combination of α -tocopherol and ascorbic acid prevented these effects. We also verified that Lys inhibited glutathione peroxidase activity 12 h after injection, without altering the activities of superoxide dismutase, catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Considering that reduction of Na^+,K^+ -ATPase activity and oxidative damage are associated with neurodegeneration, it is tempting to speculate that high concentrations of Lys may possibly underlie the neurological manifestations in diseases characterized by high tissue accumulation of this amino acid.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina-5'-difosfato;
ANOVA – análise de variância de uma via;
ATP - adenosina-5'-trifosfato;
BSA – albumina bovina sérica;
CAC – ciclo do ácido cítrico;
CAT – catalase;
CK – creatina quinase;
Cr – creatina;
CoA – Coenzima A;
DTNB - 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato);
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético;
EIM – erros inatos do metabolismo;
ERN – espécies reativas de nitrogênio;
ERO – espécies reativas de oxigênio;
GPx – glutaciona peroxidase;
GSH – glutaciona reduzida;
HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico;
HF – hiperlipinemia familiar;
HNE – 4-hidroxinonanal;
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio;
I.E. – intraestriatal;
I.P. – intraperitoneal;
LCR - lisina cetoglutarato redutase;
LDL – lipoproteína de baixa densidade;
Lis – lisina;
LOOH – lipoperóxido;
MDA – malondialdeído;
MEL – melatonina;
NAC – N-acetilcisteína;

NAD⁺ - adenina dinucleotídeo;
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido;
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido;
NO• – óxido nítrico;
O₂ – oxigênio molecular;
O₂•- – ânion superóxido;
OH• – radical hidroxila;
¹O₂ – oxigênio singlete;
ONOO- – peroxinitrito;
SAS – semialdeído α-aminoadípico sintetase;
SCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia curta
SDH - sacaropina desidrogenase;
SNC – sistema nervoso central;
SOD – superóxido dismutase;
SPSS - Statistical Package for the Social Sciences;
TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
TCA – ácido tricloroacético.

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros inatos do metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM), termo usado pela primeira vez pelo médico britânico Archibald Garrod, são distúrbios hereditários transmitidos de forma autossômica recessiva. Individualmente são raros, mas em seu conjunto sua incidência alcança pelo menos um para cada mil nascimentos. São usualmente causados por defeitos gênicos, levando à perda quase total ou ausência da atividade de uma enzima específica de uma determinada rota metabólica. O resultado é um bloqueio da rota metabólica que pode levar ao acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos e líquidos biológicos ou à falta de substâncias essenciais, acarretando muitas vezes prejuízo no desenvolvimento mental e/ou físico dos indivíduos afetados (Del Rio, 1962). Além disso, rotas alternativas também podem originar outras substâncias potencialmente tóxicas.

Dependendo da função exercida pela enzima deficiente e do tecido envolvido, bem como dos aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos, os EIM podem ser classificados em quatro grupos: desordens de transporte, desordens de armazenamento, desordens de síntese e desordens do metabolismo intermediário (Sinclair, 1982).

Pacientes portadores de algum tipo de EIM apresentam sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo entre aqueles que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, áreas do metabolismo envolvidas e tecidos afetados. É comum os pacientes afetados por EIM terem acometimento do sistema nervoso central (SNC) com retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva (Burton, 1987).

I.1.2. Metabolismo da lisina

A lisina (Lis), um aminoácido essencial para os seres humanos, é obtida essencialmente pela dieta, podendo ser utilizada para a síntese protéica ou degradada a acetil-CoA, entrando no ciclo de Krebs e formando ATP. O catabolismo da Lis contribui significativamente para a geração de nitrogênio e também como fonte de corpos cetônicos.

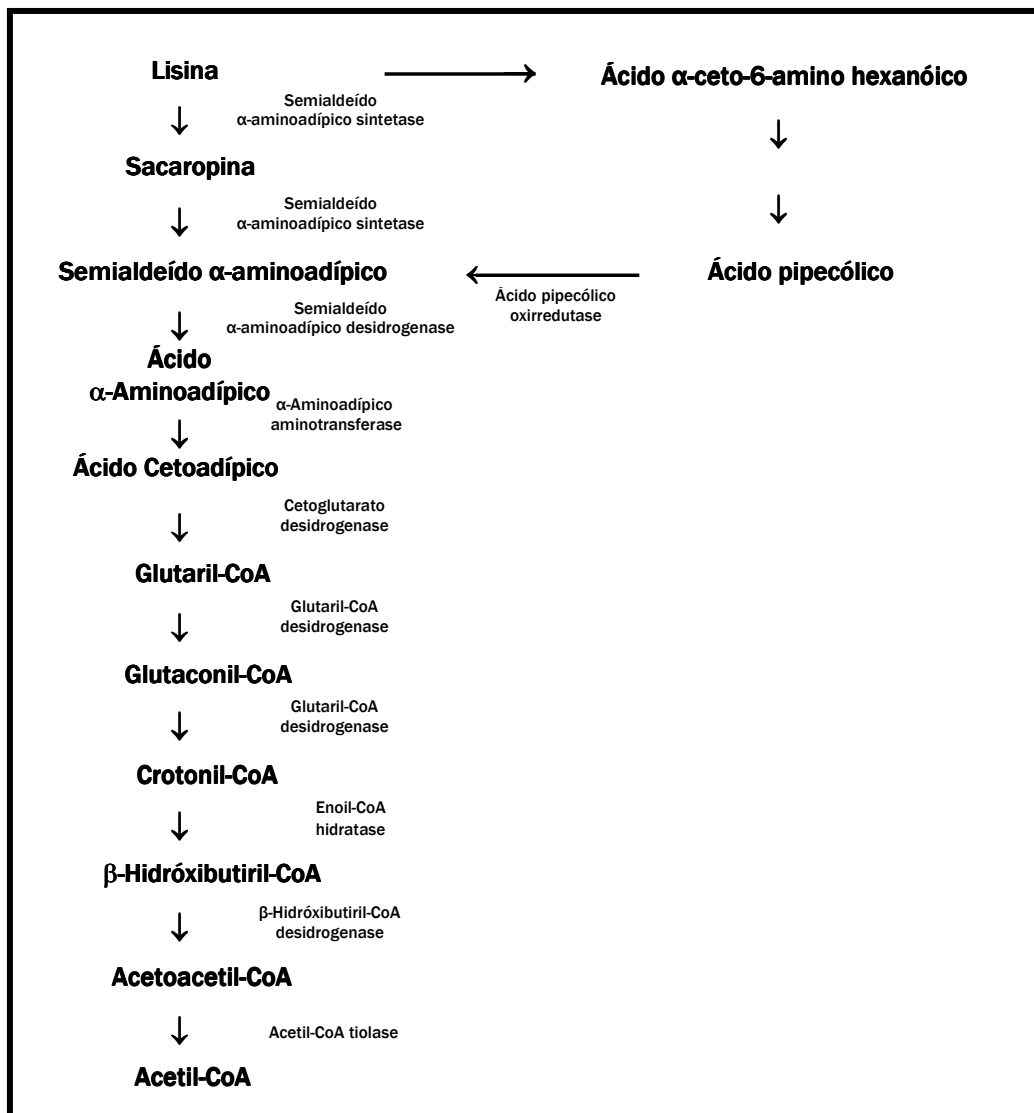


Figura 1. Rota de degradação da lisina.

A degradação de Lis até acetil-CoA pode ocorrer por duas vias metabólicas distintas, a via da sacaropina e a do ácido pipecólico (Figura 1).

1.1.2.1 Via da sacaropina

A principal via de degradação da Lis ocorre na mitocôndria e o passo inicial envolve a transaminação do grupo amino para o α -cetoglutarato resultando na formação da sacaropina. No segundo passo a sacaropina é clivada, resultando na formação de semialdeído α -aminoadípico e ácido glutâmico. Essas duas reações são catalisadas pela enzima bifuncional semialdeído α -aminoadípico sintetase (SAS), sendo o primeiro passo catalisado pela atividade enzimática lisina cetoglutarato redutase (LCR [E.C.1.5.1.8]) e o segundo catalisado pela atividade sacaropina desidrogenase (SDH [E.C.1.5.1.9]). Após essa etapa, o aldeído é oxidado a ácido aminoadípico. Passos posteriores nessa via de degradação envolvem a transaminação do grupamento amino para formação do ácido cetoadípico e sucessivas descarboxilações para formar primeiramente glutaril coenzima A (CoA) e depois crotonil-CoA, que então é oxidado a acetil-CoA (Figura 2).

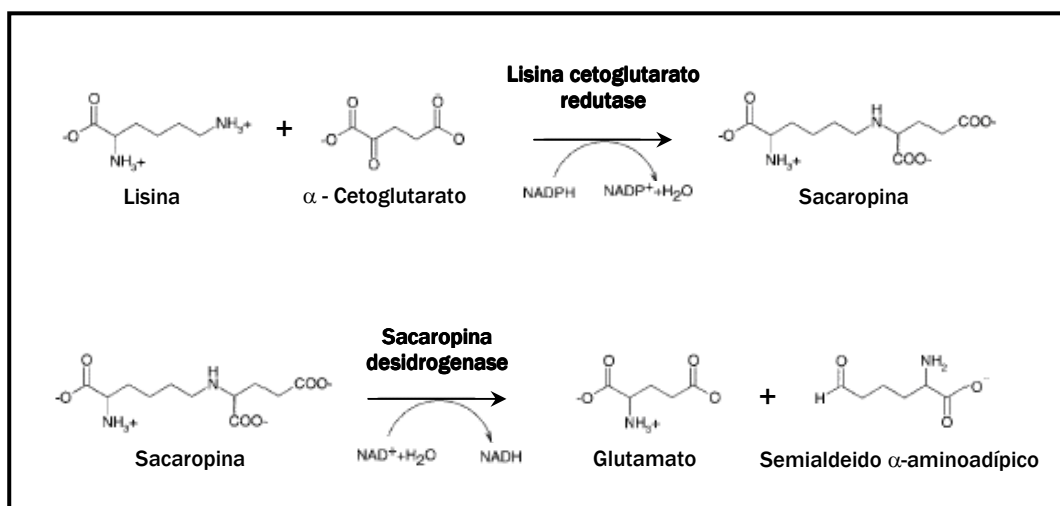


Figura 2. Via da sacaropina (Adaptado de Sacksteder *et al.*, 2000).

A via da sacaropina é ativa em cérebro fetal de ratos, gradualmente diminuindo ao longo do desenvolvimento e é pouco ativa em adultos. Já em fígado de ratos, a atividade da via da sacaropina gradualmente aumenta durante o desenvolvimento e é a principal via de degradação da Lis nesse órgão (Giacobini, 1980; Rao *et al.*, 1992).

1.1.2.2. Via do ácido pipecólico

Os peroxissomos desempenham um papel importante no metabolismo da Lis em mamíferos. É nessas organelas que ocorre a degradação da Lis pela via do ácido pipecólico. Essa via funciona quando há um excesso de L-lisina, além de ser a principal rota de degradação da D-lisina. O passo inicial é a remoção do grupo amino da Lis por desaminação oxidativa. O cetoácido formado cicliza e é reduzido a ácido pipecólico. Este último é o produto da metabolização tanto da L-lisina quanto da D-lisina, sendo posteriormente oxidado à semialdeído α - aminoadípico (Figura 3).

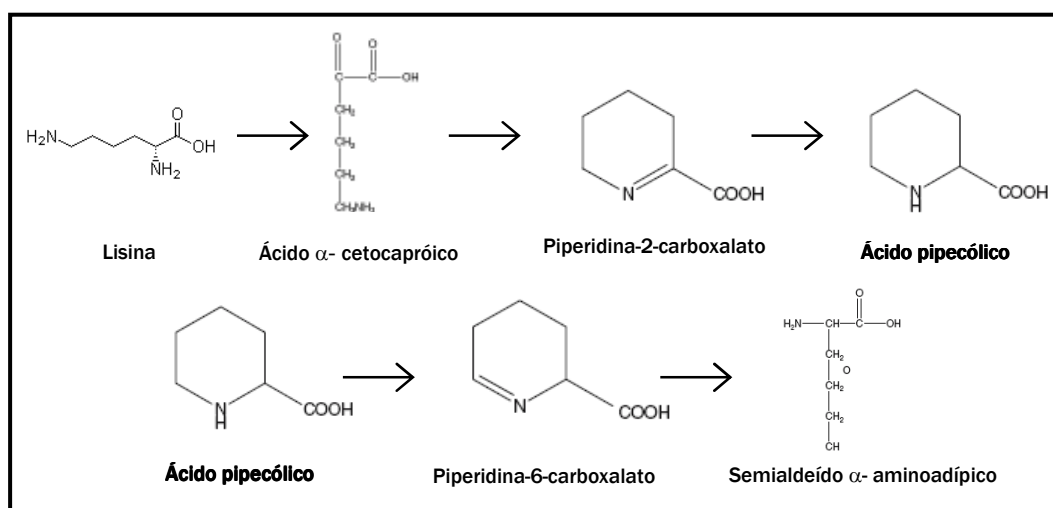


Figura 3. Via do ácido pipecólico.

Durante o desenvolvimento, com a diminuição da metabolização da Lis pela via da sacaropina no cérebro, a metabolização de L-lisina parece ocorrer principalmente através da via do ácido pipercolico nesse tecido (Chang, 1978; Giacobini, 1980; Rao *et al.*, 1992).

I.1.3. Aminoacidopatias

As aminoacidopatias compreendem uma classe de EIM em que um defeito na via metabólica de determinado aminoácido leva ao aumento das suas concentrações nos líquidos biológicos (sangue, urina, líquido, etc.) e tecidos (Chalmers e Lawson, 1982; Fernández, 2000; Scriver *et al.*, 2001). As aminoacidopatias podem também ser devidas a defeitos nos transportadores de aminoácidos presentes na membrana celular, resultando em aminoacidúria com níveis plasmáticos normais ou baixos dos aminoácidos que utilizam essas proteínas carreadoras (Seymour *et al.*, 1997).

Os aminoácidos, além de serem essenciais na síntese protéica, são componentes de muitas rotas metabólicas e da síntese de vários neurotransmissores (Ellaway *et al.*, 2002).

Pacientes afetados por aminoacidopatias apresentam principalmente sintomas de intoxicação e/ou deficiência de energia. A intoxicação se deve ao acúmulo acentuado dos aminoácidos proximais ao defeito metabólico e se caracteriza clinicamente por sintomas agudos (vômitos, coma, insuficiência hepática, convulsões, distúrbios respiratórios), podendo também haver atraso no desenvolvimento físico e psicomotor, hipotonia generalizada, cardiomiopatia, acidemia láctica, hipoglicemia, morte súbita na infância, malformações e outras manifestações. Os sintomas clínicos apresentados por neonatos portadores dessas desordens são muito similares às manifestações observadas em casos de sepsis ou asfíxia, dificultando seus diagnósticos.

Embora o diagnóstico clínico dessas doenças seja difícil devido à variabilidade da sintomatologia, os sinais mais evidentes são neurológicos, o que atesta a susceptibilidade do sistema nervoso central à toxicidade dos aminoácidos ou seus derivados. Em vários casos, os compostos que se acumulam são nutrientes essenciais em concentrações normais e agentes tóxicos em concentrações elevadas. Atraso no diagnóstico ou um tratamento inadequado freqüentemente resulta em severa morbidade e alta mortalidade. O tratamento agudo em algumas aminoacidopatias com restrição alimentar específica (proteínas, lipídeos ou glicídeos) associado ou não à suplementação de vitaminas (que ajudam nas reações enzimáticas) pode resultar em benefício rápido aos pacientes.

Quando há suspeita de que o paciente é portador de um erro inato do metabolismo, pode-se fazer uma triagem simples para doenças metabólicas hereditárias, objetivando a detecção de metabólitos acumulados no sangue e/ou excretados na urina dos afetados. A triagem simples contempla uma bateria de testes urinários, bem como cromatografia semiquantitativa de aminoácidos no sangue.

I.1.4. Erros inatos do metabolismo da lisina

I.1.4.1. Etiologia e achados laboratoriais

O aumento nas concentrações séricas de Lis (hiperlisinemia) é comumente observado em vários erros inatos do metabolismo, incluindo a hiperlisinemia familiar, bem como em alguns distúrbios do ciclo da uréia, na deficiência da piruvato carboxilase tipo B, na acidúria L-2-hidroxi glutárica (Cox, 2001; Nyhan e Ozand, 1998), na acidúria 2-amino-adípica, na hidroxiquinureninúria e na hidroxilisinúria.

O catabolismo da Lis regula os níveis de Lis em diversos órgãos. É muito ativa em tecidos cerebrais (Rao *et al.*, 1992), onde parece ser usada também para a produção de glutamato, regulando a transmissão sináptica via receptores glutamatérgicos (Papes *et al.*, 2001). Defeitos no catabolismo da Lis causam a desordem genética chamada de hiperlisinemia familiar, associada com retardo mental em alguns pacientes (Woody, 1964; Markovitz *et al.*, 1984).

A hiperlisinemia familiar (HF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo aumento da concentração plasmática de Lis devido a deficiência na enzima bifuncional SAS, a primeira enzima da principal rota de degradação da Lis. A forma nativa dessa enzima é um tetrâmero com peso molecular de aproximadamente 468 kDa composto por quatro subunidades bifuncionais de 115 kDa cada (Papes *et al.*, 2001). As duas atividades catalíticas podem ser diferentemente afetadas por mutações (Hoffman, 2006). Na maioria dos casos, as duas atividades estão severamente reduzidas, resultando predominantemente em hiperlisinemia e hiperlisinúria, acompanhadas por uma leve sacaropinúria (hiperlisinemia tipo I). Na hiperlisinemia tipo II ou sacaropinúria (Carson *et al.*, 1969), há uma pronunciada redução da atividade SDH com uma atividade residual da LCR, causando uma predominante excreção de sacaropina, que normalmente não é encontrada em líquidos biológicos de indivíduos normais.

Em recém-nascidos normais, os níveis plasmáticos de Lis são de aproximadamente 180 $\mu\text{mol/L}$ (Kamoun *et al.*, 2002). Já nos indivíduos com HF as concentrações de Lis no plasma e líquido cerebrospinal podem atingir até 1,7 mM e 270 μM , respectivamente (líquor: controles < 28 μM) (Hoffman, 2006). Nestes pacientes ocorre também uma lisinúria de até 15000 mmol/mol creatinina (controles < 70 mmol/mol creatinina). Uma

análise detalhada dos metabólitos revelou um acúmulo adicional de sacaropina, homoarginina, ácido α -aminoadípico e ácido pipecólico (Przyrembel *et al.*, 2002).

1.1.4.2. Manifestações clínicas e neuropatológicas

A relação do defeito metabólico com as manifestações clínicas não está bem estabelecida na HF. Já foram descritos alguns pacientes sem fenótipo clínico com diagnóstico acidental de hiperlisinemia. Outros pacientes portadores dessa doença foram detectados devido à investigação em casos de dano neurológico e retardo mental. Nestes casos, os sintomas incluíam retardo psicomotor, epilepsia, espasticidade, ataxia e estatura baixa (Dancis *et al.*, 1983). Dentre os achados neuropatológicos encontrados em pacientes afetados por erros inatos do metabolismo com acúmulo de Lis, foram observadas anormalidades nos gânglios da base e atrofia cortical (García-Cazorla *et al.*, 2006, Steenweg *et al.*, 2009, Braissant, 2010, Marin-Valencia *et al.*, 2010).

1.1.4.3. Diagnóstico e tratamento

A cromatografia de aminoácidos pode ser realizada em camada delgada ou em papel (semiquantitativo) (Ersser e Smith, 1976). Quando observamos que o aminoácido está em concentração mais elevada, é aconselhável realizar sua medida quantitativa para verificar a concentração exata do aminoácido, o que pode ser feito por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia de troca iônica (analisador automático de aminoácidos) (Joseph e Marsden, 1986). O diagnóstico da hiperlisinemia é fundamentalmente laboratorial e usualmente feito por um aumento significativo (2 a 50 vezes os valores de referência) na concentração sérica de lisina.

O diagnóstico confirmatório da deficiência da enzima SAS pode ser feito em fibroblastos e biópsia de tecidos pela determinação da degradação de [1-¹⁴C] lisina a ¹⁴CO₂. Ensaio específico para LCR e SDH, bem como a análise molecular também estão disponíveis (Dancis, 1979; Sacksteder *et al.*, 2000).

Durante episódios agudos de descompensação metabólica (jejum prolongado ou situações hipercatabólicas), a hiperlisinemia pode estar potencialmente associada a um risco elevado de dano cerebral nos pacientes, o que sugere que a redução da Lis alimentar deveria ser considerada no tratamento desta doença. Um controle efetivo da dieta é difícil por causa da abundância deste aminoácido nas dietas, o que faz necessário o uso de dietas sintéticas se o objetivo é reduzir os níveis plasmáticos de Lis ao nível normal (Cox, 2001).

I.1.5. Metabolismo energético cerebral

O cérebro possui uma intensa atividade metabólica, no entanto suas reservas energéticas são extremamente reduzidas em relação à sua demanda. Assim, há a necessidade de substratos energéticos para o cérebro de mamíferos, sendo a glicose o principal deles e, em contraste com outros tecidos, não necessitando de insulina para ser captada e oxidada (Dickinson, 1996). Por outro lado, o padrão de utilização deste nutriente varia conforme a etapa do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), o estado nutricional do indivíduo e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (Marks *et al.*, 1996).

O ciclo do ácido cítrico é a via comum de oxidação de glicídios, aminoácidos e ácidos graxos (aproximadamente 95 % do ATP sintetizado). O metabolismo energético cerebral se mostra essencialmente aeróbico (Clarck *et al.*, 1993). As reações anapleróticas,

que alimentam o ciclo diretamente com seus intermediários, também fornecem substratos para as reações de oxidação no cérebro. Quando não há hipóxia, a fosforilação oxidativa é dependente da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial de NADH/NAD⁺ que é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pela transferência de elétrons provenientes de reações catalisadas por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria formando assim um gradiente de prótons que, através da passagem pela ATP-sintase, resulta na fosforilação oxidativa (Erecinska e Silver, 1994). Outro importante sistema que auxilia a manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o da creatina quinase, que está presente tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transferência reversível de um grupamento fosfato da fosfocreatina para ADP, gerando ATP. Esse sistema tem sido associado a algumas funções particularmente importantes para o cérebro, como tamponamento energético (através da regeneração do ATP a da manutenção de níveis baixos de ADP) e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo (Erecinska e Silver, 1994).

1.1.5.1. Creatina quinase

A enzima creatina quinase (CK) (E.C.2.7.3.2) catalisa a reação reversível de transferência do grupamento fosfato do ATP para o grupamento guanidino da creatina (Cr), formando fosfocreatina (PCr) e ADP (Figura 4). A CK está presente em grandes quantidades em tecidos que requerem altas e flutuantes demandas de energia, como o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

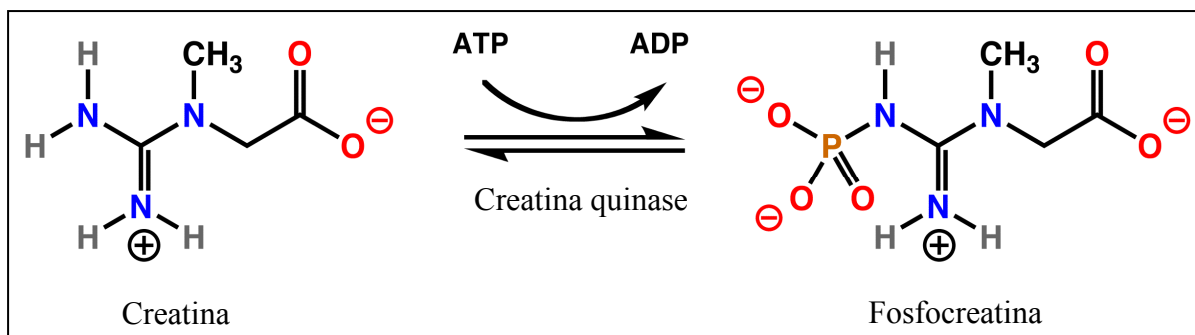


Figura 4. Reação catalisada pela creatina quinase (CK)

Foram identificadas cinco isoenzimas de CK (duas mitocondriais e três citosólicas), cujas subunidades são produzidas por genes distintos com expressão tecido-específica. As isoenzimas citosólicas (Cy-CK) existem como dímeros, compostas por dois tipos de subunidades (CK-B e CK-M), originando três diferentes isoformas: CK-MM (predominante em músculo esquelético adulto), CK-BB (predominante em cérebro) e CK-MB (predominante em músculo cardíaco) (Manos *et al.*, 1991; Molloy *et al.*, 1992). As duas isoenzimas mitocondriais, Mi-CK ubíqua e Mi-CK sarcomérica, são encontradas no espaço intermembranas, formando moléculas homodiméricas ou homooctaméricas prontamente interconvertíveis (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000). A Mi-CK octamérica é considerada a forma predominante e ativa *in vivo*, sendo muito importante para a função da enzima (Soboll *et al.*, 1999).

A Mi-CK interage simultaneamente com as membranas mitocondriais interna e externa, permanecendo acoplada à translocase de nucleotídeos de adenina, canal transportador do ATP da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. O grupamento γ -fosfato do ATP é transferido para a Mi-CK no espaço intermembranas e dessa para a Cr, formando ADP e PCr. A PCr sai da mitocôndria e se difunde através do citoplasma até os sítios de consumo de energia, onde, por ação das isoenzimas citosólicas (CK-MM, CK-MB

ou CK-BB), irá regenerar o ATP e formar novamente Cr. A Cr liberada retorna para a mitocôndria fechando o ciclo (Figura 5) (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

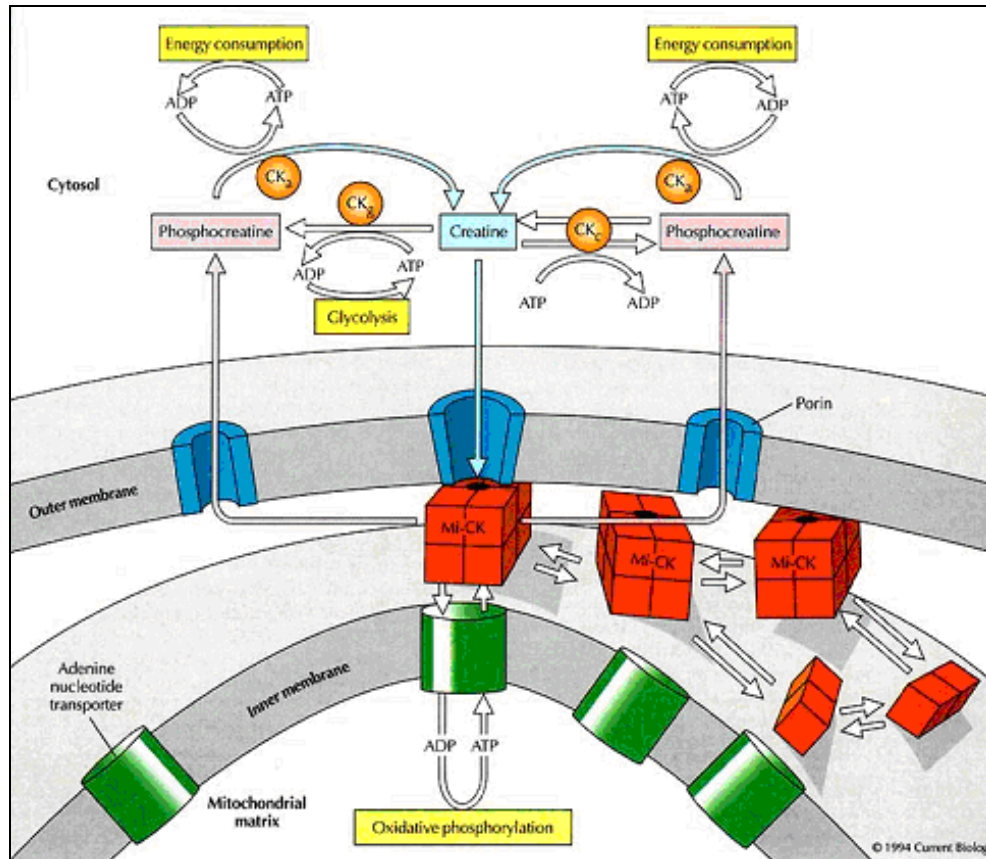


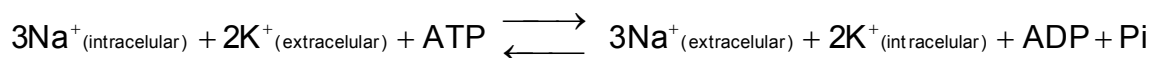
Figura 5. Função do sistema Cr/CK/PCr na difusão dos grupamentos fosfato e no tamponamento dos níveis de ATP junto aos sítios de consumo.

1.1.5.2. $Na^+, K^+-ATPase$

A enzima $Na^+, K^+-ATPase$ é uma proteína transmembrana constituída por dois tipos de subunidades: a subunidade α de 110 kDa, que contém os sítios catalíticos e de ligação de íons, e a subunidade β , que é uma glicoproteína de 55 kDa de função desconhecida, formando uma estrutura dimérica $(\alpha\beta)_2$. A função dessa enzima é translocar os cátions Na^+ e K^+ através da membrana plasmática contra seus gradientes de concentração, utilizando a

energia fornecida pela hidrólise de ATP. A enzima transporta simultaneamente 3 íons Na⁺ para fora e 2 íons K⁺ para dentro da célula. A saída de Na⁺ capacita as células animais a controlar osmoticamente seu conteúdo hídrico (Figura 6). Visto que três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular e somente duas são transportadas para o meio intracelular, o fluxo de íons Na⁺ e K⁺ produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). Esse gradiente é usado como fonte de energia para a despolarização e repolarização do potencial de membrana, para a manutenção e regulação do volume celular, para transporte ativo, transporte dependente de íons Na⁺, glicose, aminoácidos, neurotransmissores e para cotransporte/antiporte de outros íons (Geering, 1990). Todas as células eucarióticas superiores consomem o ATP para a manutenção das concentrações citosólicas e extracelulares de Na⁺ e K⁺, sendo que esse consumo pode ser da ordem de 40 a 60% nas células neuronais (Whittan, 1962).

A reação catalisada pela Na⁺,K⁺-ATPase é a seguinte:



Alterações nos mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a taxa de sódio e potássio intra e extracelular podem causar graves consequências nas células do SNC (Erecinska e Silver, 1994), tendo sido associadas à despolarização excessiva, instabilidade da membrana e descargas paroxísticas (Donaldson *et al.*, 1977).

Glicosídeos cardiotônicos, tais como a digoxina e a ouabaína, inibem a enzima Na⁺,K⁺-ATPase, ligando-se a um sítio específico na porção extracelular da proteína (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). Baixas doses de ouabaína (0,1 nmol), quando injetadas intracerebralmente em ratos, produzem lesões neuronais seletivas e, em altas doses (1 nmol), produzem necrose celular e infarto (Lees *et al.*, 1990). O efeito de radicais livres

sobre a Na^+, K^+ -ATPase tem sido citado como a principal fonte de dano celular na reperfusão ocorrida após uma isquemia do miocárdio. Estudos têm demonstrado uma inibição *in vitro* da enzima quando exposta a radicais livres ou sistemas artificiais produtores de radicais livres (Hitschke *et al.*, 1994; Tsakiris *et al.*, 2000).

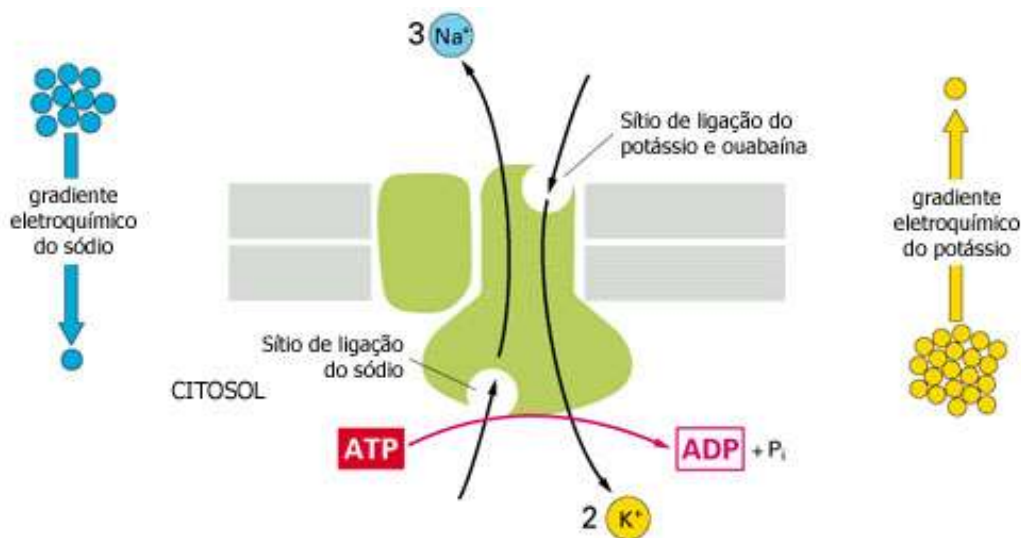


Figura 6. Transporte transmembrana de íons realizado pela enzima Na^+, K^+ -ATPase. (Adaptado de Alberts *et al.*, 2002).

I.1.6. Radicais livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e possuem a capacidade de existir de forma independente (Southorn e Powis, 1988; Halliwell e Gutteridge, 2007). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos (Halliwell e Gutteridge,

2007). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado; assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (Maxwell, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris e Chance, 1973; Roede e Jones, 2010).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicaais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio *singlet* (1O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) as principais representantes.

I.1.7. Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e

compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), dentre outras; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos; agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina (Halliwell e Gutteridge. 2007a)

I.1.8. Estresse oxidativo

Espécies reativas são necessárias para a função normal da célula, servindo como moléculas de sinalização para importantes papéis fisiológicos. Elas são continuamente produzidas e neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante. No entanto, quando produzidos em altas concentrações ou quando as defesas antioxidantes estão deficientes, as espécies reativas podem causar dano celular. Se o aumento de espécies reativas é relativamente pequeno, a resposta antioxidante será suficiente para compensar esse aumento. No entanto, sob certas condições patológicas, a produção de espécies reativas está muito aumentada, e as defesas antioxidantes podem ser insuficientes para restabelecer a homeostase redox.

O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante é descrito como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental envolvido em doenças humanas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Sies, 1985). O estresse oxidativo pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de

oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço pró-oxidante / antioxidante.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode provocar dano a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2007b). Nesses casos, a resposta à injúria tecidual pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não leva à morte celular.
- Morte celular: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las a um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, tais como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007a).

I.1.9. Mecanismos de dano celular induzido por radicais livres

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies reativas apresentam diversas funções (Bergendi

et al., 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (Delanty e Dichter, 1998). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (Ward e Peters, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (Maxwell, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação; podem causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); podem reagir com proteínas, levando à sua inativação e consequente alteração de sua função; e podem também reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (Delanty e Dichter, 1998), dentre outros efeitos.

1.1.9.1. Suscetibilidade cerebral ao dano oxidativo

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena. O alto consumo de O₂ se traduz em um aumento da atividade da cadeia respiratória, resultando em um aumento na produção do radical superóxido pela dispersão dos elétrons

Além disso, as membranas celulares ricas em ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada (PUFA) são especialmente sensíveis ao ataque oxidativo de radicais livres. Outros fatores, tais como alto conteúdo de ferro, o qual favorece a lipoperoxidação e autooxidação de neurotransmissores (Zaleska e Floyd, 1985), a grande quantidade de microglia e macrófagos residentes do sistema nervoso que podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 e a modesta defesa antioxidante (baixos níveis de catalase) (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007a) aumentam a suscetibilidade do cérebro ao dano causado por radicais livres.

1.1.9.2. Estresse oxidativo e aminoacidopatias

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese do dano neurológico de várias doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Nos últimos anos, foi também verificado que vários metabólitos acumulados em alguns EIM com comprometimento severo do SNC, incluindo aminoacidopatias, induzem estresse oxidativo no cérebro de animais experimentais (Latini *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Feksa *et al.*, 2008; Kessler *et al.*, 2008; Zugno *et al.*, 2008) e em seres humanos (Sitta *et al.*, 2006; Deon *et al.*, 2007; Barschak *et al.*, 2008a,b; Deon *et al.*, 2008), indicando que os compostos acumulados nestas doenças possam causar dano oxidativo. Além disso, a terapia com dietas restritivas também pode alterar o status antioxidante das células, em pacientes acometidos por EIM, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (Artuch *et al.*, 2004).

Dentre as aminoacidopatias, estudos recentes demonstram que a suplementação com antioxidantes, tanto em pacientes portadores de fenilcetonúria quanto em modelos animais

para a doença, parece atenuar ou reverter o dano oxidativo induzido por altas concentrações de fenilalanina (Sitta *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2010, Fernandes *et al.*, 2010). Esses resultados indicam uma possível toxicidade induzida pelo aminoácido, gerando dano oxidativo, pelo aumento na produção de espécies reativas ou ainda pela diminuição de antioxidantes.

Diversos outros estudos com desordens metabólicas mostram que o acúmulo de certos aminoácidos induz peroxidação lipídica, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição da atividade de importante enzimas antioxidantes, levando a um desequilíbrio na homeostasia celular e dano oxidativo. Dentre essas doenças, podemos citar hiperglicinemia não cetótica, hiperprolinemia tipo II, doença do xarope do bordo, hipertriptofanemia, hiperlisinemia e a síndrome HHH (Delwing *et al.*, 2003; Delwing *et al.*, 2005; Barschak, *et al.*, 2009; Feksa *et al.*, 2006; Leipnitz *et al.*, 2009; Seminotti *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2009).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de lisina sobre vários parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético em estriado de ratos jovens, no intuito de verificar alterações bioquímicas que possam contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentados por pacientes acometidos por doenças metabólicas onde a lisina se encontra em concentrações elevadas.

I.2.2. Objetivos específicos

- Estudar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de 4 μmol de lisina sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato (atividade do ciclo do ácido cítrico) em estriado de ratos jovens, 30 min, 2h e 12h após a injeção.
- Estudar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de 4 μmol de lisina sobre a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e creatina quinase (CK) em estriado de ratos jovens, 30 min, 2h e 12h após a injeção.
- Estudar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de 4 μmol de lisina sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), os níveis de glutatona reduzida (GSH) e o conteúdo de sulfidrilas em estriado de ratos jovens, 30 min, 2h e 12h após a injeção.

- Estudar os efeitos *ex vivo* da administração intraestriatal de 4 μmol de lisina sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glicose-6-fosfato desidrogenase em estriado de ratos jovens, 30 min, 2h e 12h após a injeção.

PARTE II

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). Foram feitos todos os esforços para minimizar o número e o sofrimento dos animais a serem utilizados nos experimentos.

II.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (P.A.). O aminoácido Lis foi sempre dissolvido em água e teve seu pH ajustado a 7,4, no dia da realização dos ensaios.

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; 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; Micropipetas de volume regulável Gilson; 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. Procedimento cirúrgico

II.1.4.1. Anestesia

Antes da cirurgia, os animais foram anestesiados com a mistura de cetamina (Francotar, Virbac) e xilazina (Coopazine; Coopers). O anestésico cetamina foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) conjuntamente com o sedativo/miorrelaxante/analgésico xilasina, respectivamente nas doses de 75mg/kg e 10mg/kg (Flecknell, 1996).

II.1.4.2. Coordenadas do estriado

As coordenadas para injeção intraestriatal (I.E.) de Lisina, medidas a partir do bregma, foram: AP: antero-posterior; LL: látero-lateral; DV: dorso-ventral, sempre com inclinação da cabeça de -0,33 cm, a partir de indicações do Atlas de Paxinos & Watson (1986).

Estriado: AP= $\pm 0,6$ mm; LL= $\pm 2,6$ mm; DV= $\pm 4,5$ mm

A posição correta das coordenadas foi verificada através de cirurgias-piloto, com injeção de azul de metileno 4% dissolvido em solução salina.

II.1.4.3. Craniotomia e injeção de lisina

Cada animal foi cuidadosamente colocado em um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 1404), sua cabeça imobilizada com barras inter-auriculares e a barra de pressão do incisivo (inclinação de -0,33 cm), sendo, então, a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com um bisturi com lâminas de número 20 ou 21.

Uma craniotomia bilateral foi realizada com o emprego de uma broca odontológica nos locais (sobre o crânio exposto) correspondentes às coordenadas antero-posteriores (AP) e látero-laterais (LL) do estriado.

Foi injetado 1 µl do aminoácido Lis (4 µmol) nos ratos testes ou 1 µl de uma solução de NaCl (4 µmol) nos ratos controles, lentamente durante 3 minutos em ambos os estriados, utilizando-se uma agulha fina (calibre 30) conectada por um tubo de polietileno a uma seringa Hamilton de 10 µL. A agulha foi mantida no local por mais um minuto antes de ser suavemente removida, sendo o tempo cirúrgico de aproximadamente 4 minutos para cada hemisfério. O grupo controle recebeu injeção I.E. de solução de NaCl de maneira semelhante.

Em alguns experimentos, os animais foram pré-tratados i.p. com melatonina (100 mg/kg), a combinação de α -tocoferol (vitamina E; 40 mg/kg) e ácido ascórbico (vitamina C; 100 mg/kg), creatina (50 mg/kg) ou N-acetilcisteína (150 mg/kg) por 3 dias, uma injeção por dia, após a qual eles receberam uma injeção aguda de Lis. Animais controles receberam os mesmos volumes de uma solução salina (0,9 % NaCl). Doses de melatonina, α -tocoferol mais ácido ascórbico, creatina e N-acetilcisteína foram escolhidos de acordo com Sigala e colaboradores (2006), Wyse e colaboradores (2002), Ribeiro e colaboradores (2009) e Viegas e colaboradores (2010) respectivamente.

II.1.5. Sacrifício dos animais e dissecção do estriado

Os animais foram sacrificados por decapitação 30 minutos, 2 horas ou 12 horas após o procedimento cirúrgico. O cérebro foi rapidamente retirado, o sangue removido, os bulbos olfatórios, ponte, medula, córtex cerebral e o cerebelo foram descartados e o estriado foi rapidamente dissecado.

II.1.6. Preparação das amostras

II.1.6.1. Produção de CO₂

O estriado foi pesado e homogeneizado no tampão específico usado para cada técnica. Para os experimentos de medida da produção de CO₂, o estriado foi homogeneizado (1:10, w/v) em tampão Krebs-Ringer bicarbonato, pH 7,4.

II.1.6.2. Atividade da quinase (CK)

Para a determinação da atividade da enzima creatina quinase (CK), o estriado foi homogeneizado (1:10, w/v) em uma solução salina isosmótica, centrifugado a $800 \times g$ por 10 min e o sobrenadante usado para as análises bioquímicas.

II.1.6.3. Atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

Membranas plasmáticas sinápticas isoladas de estriado de ratos foram usadas para a determinação da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase. O tecido foi homogeneizado em 10 volumes de uma solução de sacarose 0,32 mM contendo 5,0 mM HEPES e 1,0 mM EDTA. As membranas plasmáticas sinápticas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974), usando um gradiente de sacarose descontínuo que consiste de sucessivas

camadas de 0,3, 0,8 e 1,0 M. Após uma centrifugação a $69.000 \times g$ por 2 horas, a fração entre as interfaces 0,8–1,0 M de sacarose foi retirada, constituindo-se na preparação de membranas sinápticas.

II.1.6.3. Parâmetros de estresse oxidativo

Para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, foram utilizadas preparações de estriado de ratos machos. O estriado foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, w/v) de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 140 mM KCl. O homogeneizado foi centrifugado a $750 \times g$ por 10 min a 4 °C para descartar núcleos e restos celulares (Evelson et al., 2001). O precipitado foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de uma mistura de organelas preservadas contendo mitocôndrias, foi separado e usado nas análises.

II.1.7. Avaliação de parâmetros de metabolismo energético

II.1.7.1. Produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato

Para a produção de $^{14}\text{CO}_2$, homogeneizado de estriado, contendo aproximadamente 1,5–2 mg de proteína, foi pré-incubado em pequenos tubos (11 cm³) em um banho metabólico com agitação a 37 °C por 30 minutos. Após a pré-incubação, 0,1 µCi $[1-^{14}\text{C}]$ -acetato e 25 µL de uma solução 20 mM de acetato não marcado (concentração final no meio de incubação de 1,0 mM) foram adicionados ao meio de incubação em um volume final de 500 µL. Os frascos contendo poços de vidro com papel filtro dobrado em forma de “W” foram aerados com uma mistura O₂:CO₂ (95:5) e vedados com parafilme. Transcorrida uma hora de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 200 mL de TCA 50%. Foram adicionados então 100 µL de hiamina ou NaOH dentro dos poços

de vidro com a ajuda de agulhas introduzidas através da tampa de borracha. Os frascos foram novamente vedados e devolvidos ao banho por 30 min para que o CO₂ pudesse ser incorporado ao papel filtro impregnado com hiamina ou NaOH. Terminado esse procedimento, o papel filtro foi retirado com o auxílio de uma pinça e foram transferidos para vials contendo líquido de cintilação e a radioatividade foi medida (Dutra-Filho et al., 1995). Resultados foram expressos como pmol de acetato oxidado /h/mg de proteína.

II.1.7.2. Determinação da atividade da creatina quinase (CK)

A atividade da CK foi medida em sobrenadantes de homogeneizado total de estriado, usando uma mistura reacional contendo Tris-HCl 60 mM pH 7,5, fosfocreatina 7 mM, MgSO₄ 9 mM, lauril maltosídeo 0,625 mM e aproximadamente 0,4 – 1,2 µg de proteína num volume final de 100 mL. Após 10 min de pré-incubação a 37 °C, a reação começou pela adição de ADP 0,3 mmol. A reação foi parada após 10 min pela adição de 1 mmol de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB). A creatina formada foi estimada de acordo com o método colorimétrico de Hughes (1962) com algumas modificações descritas anteriormente (da Silva et al., 2004). A coloração foi obtida pela adição de 100 µL de α-naftol 2% e 100 µL de diacetil 0,05% em um volume final de 1 mL e lido por espectrofotometria a 540 nm após 20 min. Resultados foram expressos como µmol creatina/min/mg de proteína.

II.1.7.3. Determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase

O meio de reação para o ensaio da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase continha MgCl₂ 5 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM, tampão Tris-HCl 40 mM, ph 7,4, e membranas sinápticas purificadas (contendo aproximadamente 3 µg de proteínas) em um volume final de 200 µL.

O ensaio enzimático ocorreu a 37°C durante 5 minutos e começou com a adição de ATP em uma concentração final de 3 mM. A reação foi parada pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético 10%. A atividade da Mg²⁺-ATPase foi avaliada sob as mesmas condições com a adição de 1 mM de ouabaína. A atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios (Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a incubação foi medido pelo método de Chan e colaboradores (1986). A atividade enzimática foi expressa como nmol Pi liberado/min/mg de proteína.

II.1.8. Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

II.1.8.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foram determinados de acordo com o método de Yagi (1998) modificado. Um volume de amostra (contendo aproximadamente 0,3 mg de proteínas) foi adicionado a dois volumes de ácido tricloroacético 10 % e de um volume de ácido tiobarbitúrico 0,67 % preparado em sulfato de sódio. Os tubos contendo a mistura foram incubados durante 90 min em banho de água fervente e após a incubação resfriados durante 5 min. A formação de TBA-RS gera uma coloração rósea que foi extraída com 450 µL de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm e 553 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, em fluorímetro. A curva de calibração foi realizada utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBA-RS foram calculados como nmol / mg de proteína.

II.1.8.2. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998). As amostras foram diluídas em 10 volumes de tampão fosfato de sódio, pH 8,0 contendo EDTA 5mM. Foram adicionados a 100 μ L dessa preparação (contendo aproximadamente 0,3 mg de proteínas) 100 μ L de o-ftaldeído (1mg / mL preparado em metanol) e a mistura foi incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lida em fluorímetro a 350 nm (emissão) e 420 nm (excitação). As concentrações de GSH foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,01 – 1 mM) como nmol / mg de proteína.

II.1.8.3. Medida de grupamentos sulfidrilas

A medida de grupos sulfidrilas foi feita utilizando um ensaio baseado na redução de tiois a partir do ácido 5,5'- ácido ditio bis (DTNB), gerando um produto final amarelo medido espectrofotometricamente a 412nm (Kowaltowski et al., 1997). Um mL de DTNB 0,1mM preparado em tampão TRIS 0,5M contendo 0,5mM de EDTA, pH 8,0 foi adicionado à amostra (contendo aproximadamente 0,3 mg de proteínas), e incubado a temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos. A absorvância foi medida a 412nm e o resultado foi expresso nmolsTNB/mg de proteínas.

II.1.8.4. Medida da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 μ L de azida sódica 40 mM, 15 μ L de glutathiona 100 mM, 15 μ L

glutathione redutase 10 U/ml, 10 μ L NADPH 10 mM e 10 μ L de amostra (3 μ g de proteína). Esta mistura foi incubada a 25° C durante 1 minuto para estabilizar o meio e após foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorvância a 340 nm foi lida durante 240 segundos e a atividade da GPx calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da GPx foi calculada como U/mg de proteína (1U = 1 μ mol NADPH consumido/min).

II.1.8.5. Medida da atividade da catalase (CAT)

A atividade desta enzima foi determinada através do método de Aebi (1984). Em 100 μ L do sobrenadante foram adicionados 10 μ l de Triton 0,1 % seguido de agitação, esta mistura foi conservada em banho de gelo durante 15 minutos. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM pH=7,0 foram adicionados 100 μ l de H₂O₂ 30% (V/V) e 10 μ L de amostra (1 μ g de proteína). Foram pipetados 600 ml deste meio em cubeta de quartzo, e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição de 25 ml de amostra foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ em espectrofotômetro a 240 nm, em temperatura ambiente (22°C \pm 2), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43.6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U/mg proteína (1U = 1 mmol H₂O₂ consumido/min).

II.1.8.6. Medida da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida de acordo com Marklund (1985), baseando-se na capacidade do piragalol de se autooxidar em um processo altamente dependente de O₂^{•-}, que

é um substrato para a SOD. A inibição da autooxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente medida no espectrofotômetro à 420 nm. O meio de reação continha tampão Tris 50 mM, ácido etilenodiaminotetracético, pH 8,2, catalase 80 U / mL, piragalol 0,38 mM e aproximadamente 1 µg de proteína da amostra. Uma curva de calibração foi feita com SOD purificada como padrão para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados foram expressos como U / mg de proteína.

II.1.8.7. Medida da atividade da Glicose – 6- fosfato desidrogenase (G6PD)

A atividade da G6PD foi avaliada através do método de Leong e Clark (1984), no qual a mistura da reação (1 mL) contendo: Tris-HCl 100 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, NADP⁺ 0.5 mM e 10 µL de amostra (3 µg de proteína). A reação foi iniciada pela adição de glicose-6-fosfato 1 mM e a cinética da enzima foi lida em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade de G6PDH corresponde a 1 mmol de substrato transformado por minuto e a atividade específica foi representada por U / mg de proteína.

II.1.9. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi feita através do método de Bradford et al. (1976) para os ensaios da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e pelo método de Lowry et al. (1951) para a medida dos outros parâmetros, usando como padrão a albumina sérica bovina.

II.1.10. 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 por teste de Student para amostras não pareadas ou por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de raios múltiplos de Duncan, quando o valor de F foi significativo, usando o programa SPSS versão 16. As análises foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

II.2. RESULTADOS

II.2.1. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato (atividade do ciclo do ácido cítrico, CAC) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

Inicialmente estudamos o efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, $4\mu\text{mol}$) sobre a atividade do ciclo do ácido cítrico (CAC) determinada pela produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato em homogeneizado de estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. A tabela I mostra que a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato não foi alterada pela Lis.

Tabela I. Efeito da administração de lisina (Lis) sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato (função do ciclo do ácido cítrico - CAC) em estriado de ratos.

Atividade	30 min		2 h		12 h	
	NaCl	Lis	NaCl	Lis	NaCl	Lis
CAC	$79,5 \pm 7,2$	$82,5 \pm 5,3$	$60,0 \pm 1,8$	$62,1 \pm 16,6$	$72,1 \pm 0,3$	$73,5 \pm 0,4$

Valores são expressos como media \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 animais, em triplicata. A produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato é expressa como pmol de acetato oxidado/h/mg de proteína.

II.2.2. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade da enzima creatina quinase em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.

Também verificamos que a atividade da creatina quinase (CK) em sobrenadante de estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Como a tabela II mostra, a atividade dessa enzima não foi alterada pela Lis.

Tabela II. Efeito da administração de lisina (Lis) sobre a atividade da creatina quinase (CK) em estriado de ratos.

Atividade	30 min		2 h		12 h	
	NaCl	Lis	NaCl	Lis	NaCl	Lis
CK	1,98 ± 0,30	2,22 ± 0,20	7,81 ± 0,51	7,94 ± 0,39	2,66 ± 0,18	2,60 ± 0,06

Valores são expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 animais, em triplicata. A atividade da CK é expressa como $\mu\text{mol creatina}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

II.2.3. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase de membranas plasmáticas sinápticas de estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

A figura 7 mostra o efeito da administração intraestriatal de Lis sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase de membranas plasmáticas sinápticas de estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Verificamos que a Lis provocou uma inibição significativa na atividade da Na^+, K^+ -ATPase sináptica em ratos sacrificados 2 h ($t_{(8)} = 2.409$; $P < 0.05$) ou 12 h ($t_{(8)} = 2.831$; $P < 0.05$) após injeção, sem alterar essa atividade 30 min após sua administração.

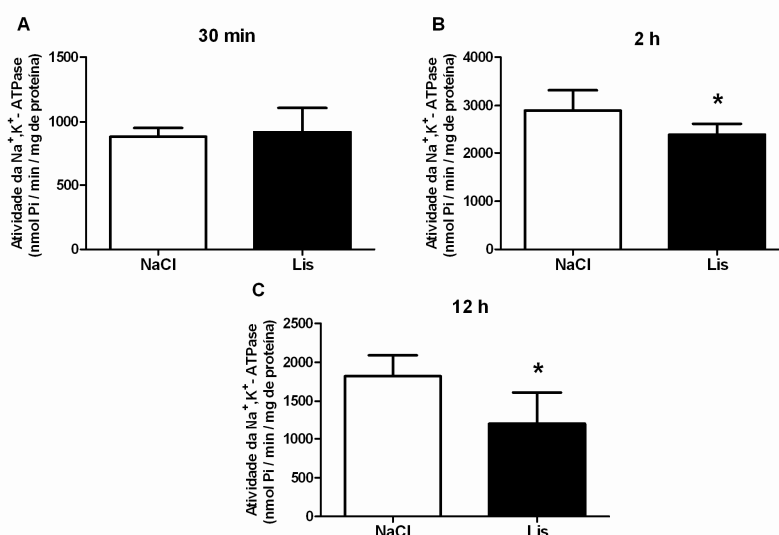


Figura 7. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, 4 μmol) sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membranas plasmáticas sinápticas de estriado de ratos 30 min (A), 2 (B) e 12 h (C) após injeção. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 animais, em duplicata. * $P < 0,05$ comparado aos ratos que receberam injeção intraestriatal de NaCl (teste de Student para amostras não pareadas).

II.2.4. Efeito da melatonina (A), combinação de α -tocoferol com ascorbato (B), creatina (C) e N-acetilcisteína (D) sobre a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela administração intraestriatal de lisina

A figura 8 mostra o efeito do pré-tratamento de melatonina, combinação de α -tocoferol com ácido ascórbico, creatina ou N-acetilcisteína por injeção intraperitoneal por 3 dias, uma vez por dia, sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membranas sinápticas de estriado de ratos causada por lisina, 2 h após sua administração. Foi verificado que o pré-tratamento com os antioxidantes não foi capaz de prevenir a diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela Lis (A [$F_{(2,11)} = 25,08; P < 0,01$]; B: [$F_{(2,11)} = 24,85; P < 0,01$], C: [$F_{(2,11)} = 21,54; P < 0,01$]), D: [$F_{(2,11)} = 22,56; P < 0,01$]).

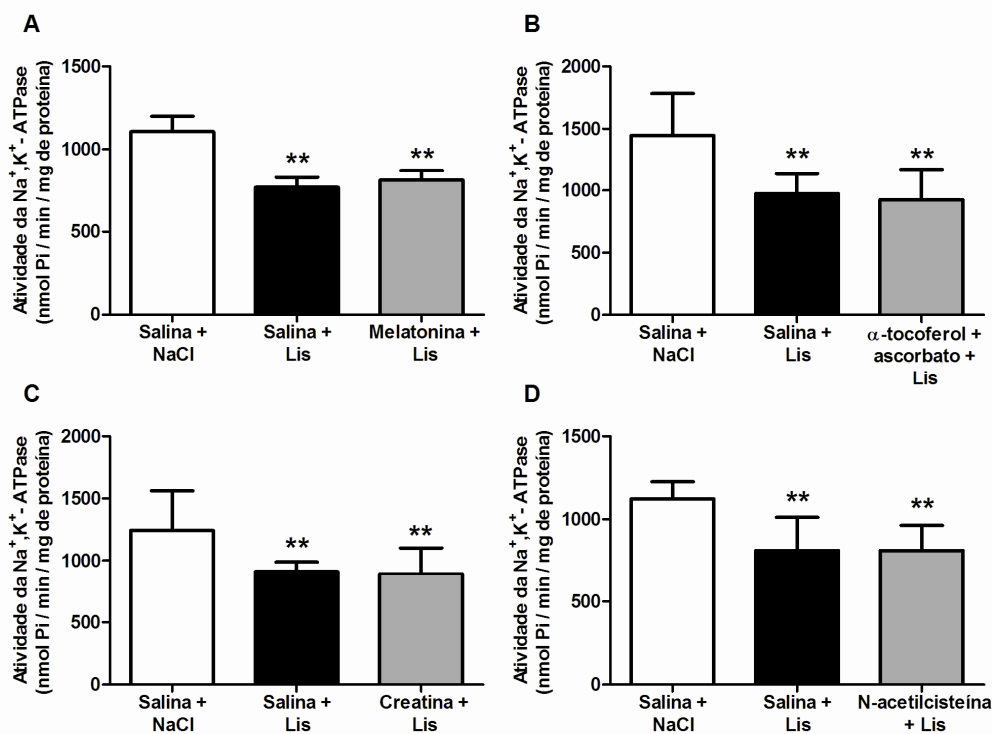


Figura 8. Efeito da melatonina (A), combinação de α -tocoferol com ascorbato (B), creatina (C) e N-acetilcisteína (D) sobre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase causada pela injeção intraestriatal de lisina (Lis, 4 μmol). Animais foram pré-tratados com salina (0,9% NaCl, i.p.), melatonina (100 mg/kg, i.p.), α -tocoferol mais ascorbato (40 mg/kg; 100 mg/kg, i.p.), creatina (50 mg/kg, i.p.) ou N-acetilcisteína (50 mg/kg, i.p) por 3 dias, uma vez por dia, e sacrificados 2 h após a injeção intraestriatal de lisina. de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 - 6 animais, em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com NaCl; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com Lis (ANOVA seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan).

II.2.5. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

A figura 9 mostra o efeito da administração intraestriatal *in vivo* de lisina sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Pode-se verificar que a administração de Lis aumentou significativamente esse parâmetro 30 min ($t_{(8)} = 7,877$; $P < 0,001$) e 2 h ($t_{(6)} = 3,070$; $P < 0,001$) após a injeção.

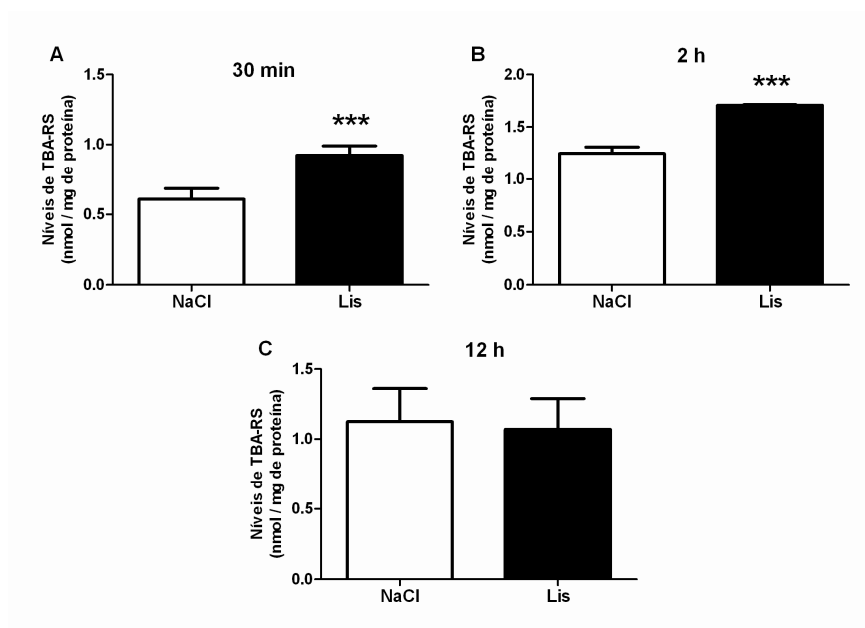


Figure 9. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, 4 μ mol) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos 30 min (A), 2 (B) e 12 h (C) após injeção. Os valores são expressos como media \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 animais, em triplicata. *** $P < 0.001$ comparado aos ratos que receberam injeção intraestriatal de NaCl (teste de Student para amostras não pareadas).

II.2.6. Efeito da melatonina (A), α -tocoferol mais ascorbato (B) e creatina (C) sobre o aumento dos níveis das substâncias reativas ao ácido-tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela administração intraestriatal de lisina

A figura 10 mostra o efeito do pré-tratamento intraperitoneal de melatonina, combinação de α -tocoferol e ácido ascórbico ou creatina por 3 dias, uma vez por dia, sobre o aumento de TBA-RS induzido por lisina, 2 h após sua administração. Foi verificado que o pré-tratamento com melatonina e a combinação de α -tocoferol e ácido ascórbico (Figura 13A: [$F_{(3,16)} = 4.771$; $P < 0.01$]; 13B: [$F_{(3,20)} = 4.507$; $P < 0.01$]) foram capazes de prevenir aumento de TBA-RS causado pela Lis, enquanto que a creatina não alterou esse aumento.

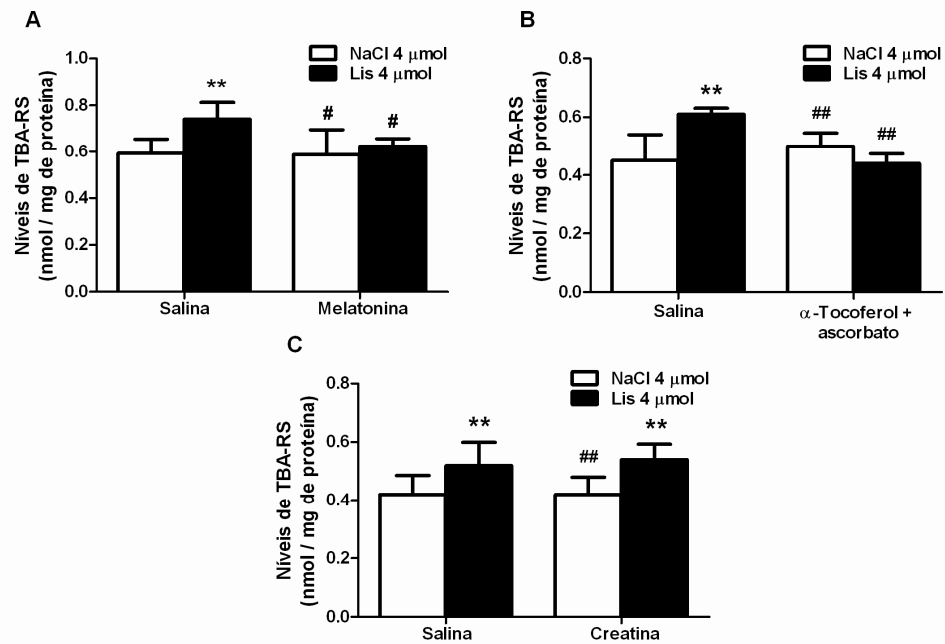


Figura 10. Efeito da melatonina (A), combinação de α -tocoferol com ascorbato (B) e creatina (C) sobre o aumento dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela injeção intraestriatal de lisina (Lis, 4 μ mol). Animais foram pré-tratados com salina (0,9% NaCl, i.p.), melatonina (100 mg/kg, i.p.), α -tocoferol mais ascorbato (40 mg/kg; 100 mg/kg, i.p.) ou creatina (50 mg/kg, i.p.) por 3 dias, uma vez por dia, e sacrificados 2 h após a injeção intraestriatal de lisina. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 - 6 animais, em triplicata. ** $P < 0.01$ comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com NaCl; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com Lis (ANOVA seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan).

II.2.7. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

A figura 11 mostra o efeito da administração intraestriatal *in vivo* de lisina sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Foi observado que a administração de Lis diminuiu significativamente esse parâmetro 30 min ($t_{(8)} = 7,693$; $P < 0,05$) e 2 h ($t_{(6)} = 4,741$; $P < 0,05$) após a injeção.

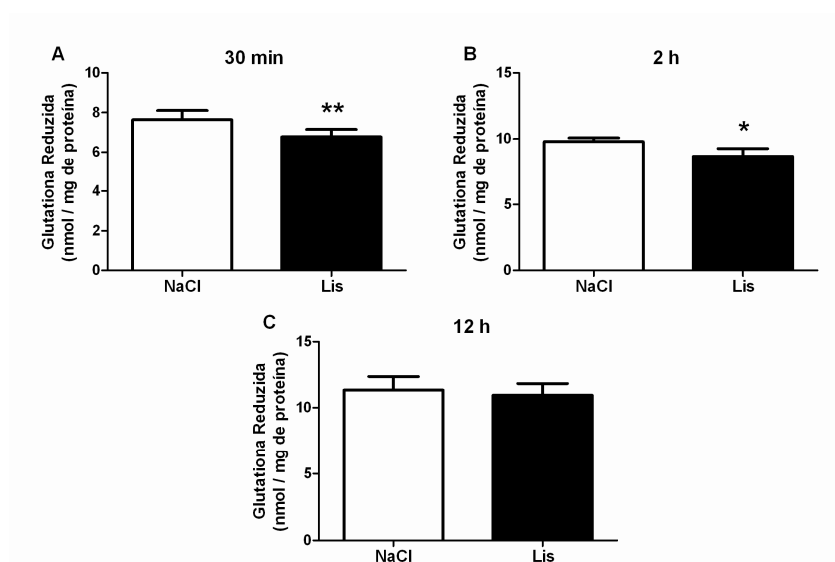


Figure 11. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, 4 μmol) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em estriado de ratos 30 min, 2 h e 12 h após injeção. de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 - 6 animais, em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado aos ratos que receberam injeção intraestriatal de NaCl (teste de Student para amostras não pareadas).

II.2.8. Efeito da melatonina (A), combinação do α -tocoferol com ascorbato (B) e creatina (C) sobre a diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) causada pela administração intraestriatal de lisina

A figura 12 mostra o efeito do pré-tratamento intraperitoneal de melatonina, combinação de α -tocoferol com ácido ascórbico ou creatina por 3 dias, uma vez por dia, sobre a diminuição de GSH induzida por lisina, 2 h após sua administração. Foi verificado que o pré-tratamento com melatonina e a combinação de α -tocoferol e ácido ascórbico (15 [F_(3,16) = 9,445; P < 0,001]; 15B: [F_(3,13) = 5,824; P < 0,05]) foram capazes de prevenir a diminuição de GSH causada pela Lis, enquanto que a creatina não foi capaz de prevenir essa diminuição.

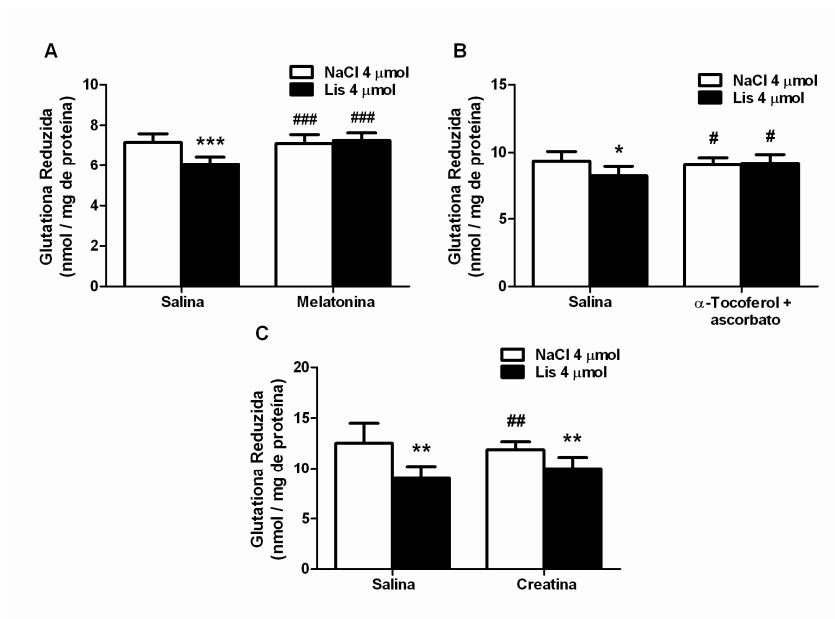


Figura 12. Efeito da melatonina (A), combinação de α -tocoferol com ascorbato (B) e creatina (C) sobre a diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) causada pela injeção intraestriatal de lisina (Lis, 4 μ mol). Animais foram pré-tratados com salina (0,9% NaCl, i.p.), melatonina (100 mg/kg, i.p.), α -tocoferol mais ascorbato (40 mg/kg; 100 mg/kg, i.p.) ou creatina (50 mg/kg, i.p.) por 3 dias, uma vez por dia, e sacrificados 2 h após a injeção intraestriatal de lisina. Os valores são expressos como media \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 – 6 animais, em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com NaCl; # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$, comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados i.e. com Lis (ANOVA seguida pelo teste de raios múltiplos de Duncan).

II.2.9. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre o conteúdo de grupamento sulfidrila em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

A tabela II mostra o efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, 4 μ mol) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila em estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Foi observado que a administração de Lis não alterou significativamente esse parâmetro nos três tempos estudados.

Tabela III. Efeito da administração de lisina (Lis) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila em estriado de ratos

Tempo	NaCl	Lis
30 min	85,6 \pm 7,53	86,18 \pm 5,84
2 horas	83,1 \pm 4,68	84,24 \pm 9,08
12 horas	84,9 \pm 4,16	87,95 \pm 7,45

Os valores (nmol de TNB / mg de proteína) são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 - 6 animais, em triplicata.

II.2.10. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase, catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção

A tabela IV mostra o efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis, 4 μ mol) sobre a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase, catalase, superóxido

dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em estriado de ratos sacrificados 30 min, 2 ou 12 horas após injeção de Lis ou NaCl. Foi observado que a administração de Lis diminuiu significativamente a atividade da GPx 12 h ($t_{(8)} = 9,351$; $P < 0,001$) após injeção.

Tabela IV. Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) em estriado de ratos

Atividade	30 min		2 h		12 h	
	NaCl	Lis	NaCl	Lis	NaCl	Lis
CAT	2,03 ± 0,15	1,94 ± 0,16	3,05 ± 0,32	3,05 ± 0,33	3,51 ± 0,32	3,72 ± 0,45
GPx	14,7 ± 0,60	13,73 ± 1,06	14,72 ± 1,22	14,2 ± 1,68	16,4 ± 0,75	11,3 ± 0,95***
SOD	1,42 ± 0,12	1,5 ± 0,18	2,82 ± 0,63	2,71 ± 0,51	1,94 ± 0,12	1,90 ± 0,18
G6PD	10,1 ± 0,59	9,64 ± 0,43	8,73 ± 1,66	8,00 ± 1,46	9,40 ± 0,51	9,88 ± 0,48

Valores são expressos como média ± desvio de experimentos realizados com amostras de estriado obtidas de 5 – 6 animais, em triplicata. Uma unidade de CAT é definida como 1 µmol de H₂O₂ consumido por minuto; uma unidade de G6PD é definida como 1 µmol de substrato transformado por minuto; uma unidade de GPx é definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto; uma unidade de SOD é definida como 50% da inibição da autooxidação do pirogalol. Valores são expressos como U / mg de protein. *** $P < 0,001$ comparado a NaCl (teste de Student para amostras não pareadas).

PARTE III

III.1. DISCUSSÃO

A sintomatologia neurológica que ocorre em pacientes com hiperlisinemia secundária a alguns erros inatos do metabolismo sugere um possível envolvimento da lisina (Lis) na fisiopatologia do dano cerebral apresentado pelos pacientes acometidos por essas doenças. Particularmente, apesar de um número considerável de pacientes afetados pela hiperlisinemia familiar (HF) apresentar sintomas neurológicos, incluindo retardo mental (Woody, 1964; Ghadimi *et al.*, 1965; Armstrong e Robinow, 1967; Markovitz *et al.*, 1984), alguns relatos mostram que muitos pacientes afetados pela doença são assintomáticos. Enfatize-se que na deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD) fatores ambientais (estresse metabólico com hipertermia, etc.) associados a defeitos no gene da SCAD parecem ser decisivos para a manifestação da doença (Corydon *et al.*, 2001; van Maldegem *et al.*, 2006; Battisti *et al.*, 2007; Tein *et al.*, 2008). Portanto, é possível que os achados clínicos da HF possam ocorrer pela combinação de mutações no gene responsável por codificar a proteína bifuncional semialdeído α -aminoadípico sintetase com outros fatores em uma parcela dos indivíduos afetados. Além disso, tendo em vista que a hiperlisinemia também é encontrada em outras desordens neurometabólicas hereditárias além da HF (Hoffmann, 2006; Cox, 2001; Nyhan e Ozand, 1998), parece provável o envolvimento da Lis como agente neurotóxico na neurodegeneração característica dos pacientes portadores dessas doenças e merece investigação.

Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a Lis causa lipoperoxidação e diminui as concentrações de GSH em córtex cerebral de ratos jovens (Seminotti *et al.*, 2008), além de alterar o metabolismo energético cerebral *in vitro* (Tonin *et al.*, 2008). O presente estudo investigou o efeito da administração intraestriatal de Lis sobre a homeostasia mitocondrial, avaliando importantes parâmetros de metabolismo

energético e estresse oxidativo, 30 minutos, 2 ou 12 h após injeção. Através dessa abordagem *in vivo*, em contraste com os estudos prévios *in vitro* realizados com altas concentrações de Lis, presume-se que concentrações baixas de Lis estavam presentes nos ensaios bioquímicos realizados, visto que os vários passos de preparação do estriado envolveram diluição do tecido devido a homogeneizações e procedimentos de lavagem. Assim, os efeitos detectados deveriam ser atribuídos fundamentalmente à ação primária do aminoácido. Deve-se ainda ressaltar que o transporte de Lis através da barreira hematoencefálica é relativamente fácil (Smith, 2000) e que a sua administração em camundongos knockout para a enzima glutaril CoA desidrogenase, um modelo para a acidemia glutárica tipo I, demonstrou causar graves danos cerebrais (Zinnanti e Lazovic, 2010).

Inicialmente observamos que a injeção intraestriatal de Lis não afetou a atividade do ciclo do ácido cítrico (CAC) medida por meio da produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato, sugerindo que esse amino ácido não tem um efeito importante nessa via essencial para a produção de energia. A atividade da enzima CK também não foi alterada pela administração *in vivo* de Lis, indicando que a Lis não prejudica essa atividade essencial para a transferência intracelular de ATP. Em contraste, a Lis inibiu significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de membranas plasmáticas sinápticas obtida de estriado de ratos preparado 2 e 12 h após a injeção. No que diz respeito ao mecanismo pelo qual Lis reduziu esta importante atividade, pode-se presumir que as alterações na fluidez da membrana (Mazzanti et al., 1992; Carfagna e Muhoberac, 1993; Kamboj et al, 2009) e/ou a alta vulnerabilidade da enzima ao ataque de radicais livres (Rustin e Rötig, 2002; Yousef et al., 2002) poderiam ser responsáveis pelo decréscimo na atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzido pela Lis.

Alterações na fluidez de membrana devido a Lis são improváveis, uma vez que ocorrem devido à incorporação de substâncias hidrofóbicas na membrana plasmática, alterando as associações entre lipídios e a enzima e a lisina é um composto polar que dificilmente seria incorporado pela membrana celular (Carfagna e Muhoberac, 1993; Kimmelberg e Pahadjopoulos, 1974; Abeywardena *et al.*, 1983). Por outro lado, considerando que a Lis induz estresse oxidativo *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral (Seminotti *et al.*, 2008), é possível que a redução desta atividade enzimática causada pela Lis possa ter ocorrido através de dano oxidativo à Na⁺,K⁺-ATPase ou aos lipídios de membrana, com consequente alteração da fluidez da membrana. No entanto, demonstramos que o pré-tratamento os antioxidantes melatonina, pela combinação de ácido ascórbico e α -tocoferol, N-acetilcisteína e creatina não foram capazes de prevenir esse efeito inibitório da Lis sobre a Na⁺,K⁺-ATPase em membranas plasmáticas purificadas, o que a princípio torna improvável um dano oxidativo importante à enzima ou a outros componentes da membrana plasmática.

Também investigamos o papel da administração *in vivo* de Lis sobre parâmetros relevantes de estresse oxidativo. Observamos que uma única injeção intraestriatal de Lis aumentou significativamente os níveis de TBA-RS em estriado 30 minutos e 2 h após injeção. Desde que a medida de TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formado, um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007), os valores aumentados desse parâmetro induzidos por Lis indicam que esse amino ácido causou lipoperoxidação *in vivo*. Esses resultados corroboram com nossos achados prévios *in vitro* mostrando que a presença de Lis no ensaio aumentou os níveis de TBA-RS em cérebro de ratos *in vitro* (Seminotti *et al.*, 2008). Outros achados da presente investigação foram que o pré-tratamento i.p com os antioxidantes melatonina ou a

combinação de α -tocoferol e ascorbato preveniram a lipoperoxidação induzida pela Lis, indicando que o dano lipídico oxidativo foi provocado por espécies reativas, especialmente pelos radicais peroxila e hidroxila que são seqüestrados por esses antioxidantes.

Distintamente do efeito provocado pela Lis sobre lipídios, a administração deste aminoácido não foi capaz de causar alteração na concentração de sulfidrilas no estriado dos animais, indicando que não provoca dano protéico oxidativo. No entanto, outros parâmetros mais sensíveis de oxidação protéica, tais como determinação da formação de carbonilas, deveriam ser investigados para se avaliar melhor essa ação oxidativa da Lis sobre proteínas.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante, a Lis reduziu significativamente o conteúdo total de GSH em estriado de ratos 30 minutos e 2 h após a injeção de Lis. A diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas está igualmente em consonância com os nossos achados anteriores *in vitro* (Seminotti et al., 2008). Considerando que GSH é um importante tampão redox da célula, o principal antioxidante no cérebro e é usado para avaliar a capacidade antioxidante não enzimática do tecido em evitar os danos associados a processos envolvendo radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007), pode-se presumir que as defesas antioxidantes não-enzimáticas estriatais foram comprometidas pela administração *in vivo* de Lis. Além disso, é possível que a redução dos níveis de GSH possam refletir um aumento da geração de espécies reativas provocado pela Lis. Essa presunção é corroborada pelos achados de que o pré-tratamento com a melatonina ou pela combinação de α -tocopherol que seqüestram estas espécies reativas de oxigênio (Martin et al, 2000) preveniu esse efeito. Ressalta-se que o α -tocoferol (vitamina E) é uma vitamina lipossolúvel que interage com as membranas celulares, sequestra radicais livres, especialmente peroxila, e interrompe a cadeia oxidativa que danifica células, impedindo a

propagação descontrolada de peroxidação lipídica por radicais livres (Burton et al., 1990). O radical tocoferoxil resultante requer ascorbato (vitamina C) para a sua regeneração ao α -tocoferol reduzido (Frei et al., 1990; Carr e Frei, 1999). Além disso, ascorbato *per se* é também um seqüestrador do radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 2007). Já a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um antioxidante endógeno secretado pela glândula pineal eficaz em combater radicais peroxila e hidroxila (Martin et al., 2000), sendo capaz de seqüestrar eficientemente os radicais hidroxila e peroxila (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 1997).

Desde que GSH é considerada uma importante defesa contra o dano oxidativo lipídico no cérebro, eliminando peróxido de hidrogênio, radicais peroxila e hidroxila formados durante esse processo, também é possível que a peroxidação lipídica induzida por Lis possa ser secundária à redução das concentrações de GSH. Portanto, é concebível que, principalmente os radicais hidroxila e peroxila estejam envolvidos no dano oxidativo induzido *in vivo* por Lis.

Por outro lado, a creatina não alterou os efeitos pró-oxidantes da Lis. Já foi demonstrado que essa molécula tem efeitos neuroprotetores contra toxicidade de substâncias que causam déficit de energia *in vivo* (Matthews *et al.*, 1998; Brustovetsky *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2006) que tem sido atribuídos principalmente à sua capacidade de tamponamento dos níveis celulares de ATP juntamente com propriedades antioxidantes mitocondriais (Sestili *et al.*, 2006). Essas observações, aliadas aos nossos achados mostrando que o funcionamento do CAC e a atividade da CK não foram alterados pela Lis, indicam que o estresse oxidativo induzido por Lis provavelmente não foi uma consequência de disfunção mitocondrial cerebral levando ao aumento secundário da produção de radicais livres.

Uma possível interpretação para o aumento da peroxidação lipídica (aumento de TBA-RS) e da redução de defesas antioxidantes (diminuição de GSH) observados 30 minutos e 2 horas após a administração de Lis é que esses efeitos ocorreram a curto prazo ainda quando da presença do aminoácido no período do sacrifício dos animais e, portanto, poderiam estar relacionados à formação de radicais livres *in situ*, enquanto o efeito inibitório da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase observado 2 e 12 horas após a injeção de Lis foi provavelmente devido a um dano a longo prazo na proteína.

Também foi verificado que a administração de Lis reduziu significativamente a atividade da GPx, sem alterar as atividades da CAT, SOD e G6PD no estriado 12 horas após a injeção. Embora não possamos explicar os mecanismos pelos quais a atividade da GPx foi reduzida por este aminoácido, tem sido sugerido que uma diminuição na atividade da GPx possa ser devido a espécies reativas de oxigênio, provocando uma modificação sítio específica em um aminoácido (Singh et al., 2004). Por outro lado, a redução da atividade da GPx pode resultar em excesso de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de ácidos graxos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Singh et al., 2004), gerando outras formas de radicais a partir de carbono, nitrogênio e oxigênio, tais como radicais hidroxila através da reação de Fenton.

Como o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes totais e as espécies reativas geradas em um tecido, os presentes dados indicam fortemente que a Lis induz estresse oxidativo em estriado de ratos *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 2007). Deve ser enfatizado que as espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar diferentes moléculas, incluindo lipídios, proteínas e DNA, o que representa um evento chave na cascata de patogenicidade, levando à morte celular por necrose ou apoptose (Kroemer e Reed, 2000; Niizuma et al., 2009; Circu e Aw, 2010). Além disso, o estresse

oxidativo é uma condição prejudicial, especialmente para o cérebro em comparação com outros tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Isso é explicado pelo fato de que o cérebro tem uma alta taxa de metabolismo oxidativo associado à produção de ROS, menor atividade de enzimas antioxidantes, reduzidas concentrações de antioxidantes não enzimáticos e maior potencial de peroxidação devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell e Gutteridge, 2007).

É difícil determinar a relevância fisiopatológica dos presentes resultados, já que as concentrações de Lis no cérebro ainda não estão estabelecidas nas patologias caracterizadas por metabolismo alterado de Lis. No entanto, deve-se enfatizar que a Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima crucial responsável pela geração do potencial de membrana, através do transporte ativo dos íons sódio e potássio no SNC, necessária para a manter a excitabilidade neuronal e o controle do volume celular. Está presente em altas concentrações nas membranas celulares cerebrais, consumindo em torno de 40-50% de ATP gerado nesse tecido (Wheeler et al., 1975, Erecinska e Silver, 1994; Erecinska et al., 2004). Portanto, considerando que a manutenção da atividade da Na^+, K^+ -ATPase é essencial para o funcionamento cerebral e a redução de sua atividade está associada com excitotoxicidade, dano neuronal e epilepsia (Grisar, 1984; Benari 1985; Lees et al., 1990; Satoh e Nakazato, 1992; Lees, 1993; Lees e Leong, 1995), poderia se presumir que a redução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida por Lis possa prejudicar a neurotransmissão, especialmente em situações de estresse com descompensação metabólica caracterizadas por intenso catabolismo e proteólise, em que os níveis de aminoácidos (e de Lis) dentro das células neurais aumentam substancialmente.

III.2. CONCLUSÕES

Concluindo, os resultados deste trabalho mostram que a injeção intraestriatal de Lis inibe a atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase, uma importante enzima do metabolismo energético celular, sem alterar as atividades da enzima CK e do CAC. A administração aguda desse aminoácido também aumentou significativamente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), diminuiu as concentrações de glutatona reduzida (GSH) e inibiu a atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx), indicando um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes induzido pela injeção de Lis.

Além disso, o pré-tratamento com os antioxidantes melatonina e a combinação de α -tocoferol mais ácido ascórbico previniu o aumento de TBA-RS e a diminuição das concentrações de GSH induzido pela administração intraestriatal de Lis, enquanto que o uso de antioxidantes não previniu a inibição da atividade da enzima Na^+K^+ -ATPase. Levando esses dados em consideração, podemos sugerir uma melhor investigação no intuito de futuramente usar antioxidantes como terapia coadjuvante no tratamento de pacientes afetados por doenças em que se acumula Lis.

Acreditamos que esse é primeiro relato mostrando que a Lis induz *in vivo* dano oxidativo lipídico e reduz a atividade de uma enzima essencial para a neurotransmissão no cérebro. Pode-se presumir que esses mecanismos possam contribuir para o entendimento das manifestações neurológicas em doenças com acúmulo cerebral de altas concentrações de Lis.

III.3. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular *in vivo* de Lis sobre parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo e dano ao DNA em hipocampo e córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar morfologia, viabilidade e morte celular por imunohistoquímica após administração intracerebroventricular de Lis em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeywardena, M.Y., Allen, T.M., Charnock, J.S. Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochim Biophys Acta* 729:62–74, 1983.

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Macías, M., Muñoz Hoyos, A., Molina Carballo, A., Arauzo, M., Montes, R. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 19:57-63, 1995.

Aebi, H. Catalase, *in vitro*. *Meth Enzymol* 105:121-126, 1984.

Amaral, A.U., Leipnitz, G., Fernandes, C.G., Seminotti, B., Zanatta, A., Viegas, C.M., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. Evidence that the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome induce oxidative stress in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci* 27:635-41, 2009.

Armstrong, M.D., Robinow, M. A case of hyperlysinemia: biochemical and clinical observations. *Pediatrics* 39:546, 1967.

Barschak, A.G., Marchesan, C., Sitta, A., Deon, M., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41:317-324, 2008a.

Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71-80, 2008b.

Barschak, A.G., Sitta, A., Deon, M., Busanello, E.N., Coelho, D.M., Cipriani, F., Dutra-Filho, C.S., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. *Clin Biochem* 42:462-6, 2009.

Battisti, C., Forte, F., Molinelli, M., Funghini, S., Pasquini, E., Tassini, M., Dotti, M.T., Federico, A. A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical, bioquematical, genetic and 1H-NMR spectroscopic studies. *Neurol Sci* 28:328-330, 2007.

Benari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid -mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375–403, 1985.

Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874, 1999.

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.

Braissant, O. Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 100:S3-S12, 2010.

Browne, R.W., Armstrong, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352, 1998.

Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Dubinsky, J.M. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem.* 76:425–434, 2001.

Boveris, A., Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 134:707-716, 1973.

Burton, B.K. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 79:359-369, 1987.

Burton, K.P., Morris, A.C., Massey, K.D., Buja, L.M., Hagler, H.K. Free radicals alter ionic calcium levels and membrane phospholipids in cultured rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 22:1035-1047, 1990.

Carfagna, M.A., Muhoberac, B.B. Interactions of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: Structure mechanism relationships in inhibition of neuronal Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Mol Pharmacol* 44:129–141, 1993.

Carr, A., Frei, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13:1007–1024, 1999.

Carson, N.A.J., Allen, J.D., Holt, K.S., Ireland, J.T., Pollitt, R.J. Saccharopinuria: a new inborn error of lysine metabolism. *Enzymopenic anemias, lysosomes, and other papers. Proc 6th Symposium of SSIEM.* Livingstone, Edinburgh, pp. 163-173, 1969.

Chalmers, R.A., Lawson, A.M. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. 1st ed. London: Chapman and Hall, 1982.

Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380, 1986.

Chang, Y.F. Lysine metabolism in rat brain: Pípecolic acid-forming pathway. *J Neurochem* 30:347-354, 1978.

Circu, M.L., Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762, 2010.

Clark, J.B., Bates, T.E., Cullingford, T., Land, J.M. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Dev Neurosci Basel* 17:174-180, 1993.

Corydon M.J., Vockley J., Rinaldo P., Rhead W.J., Kjeldsen M., Winter V., Riggs C., Babovic-Vuksanovic D., Smeitink J., De Jong J., Levy H., Sewell A.C., Roe C., Matern D., Dasouki M., Gregersen N. Role of common gene variations in the molecular

pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res* 49:18-23, 2001.

Cox, R.P. Errors of lysine metabolism. Em: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill Inc, New York, pp 1965–1970, 2001.

Dancis, J., Hutzler, J., Cox, R.P. Familial hyperlysinemia: enzyme studies, diagnostic methods, comments on terminology. *Am J Hum Genet* 31:290-299, 1979.

Dancis, J., Hutzler, J., Ampola, J.G., Shih, V.E., Van Gelderen, H.H., Kirby, L.T., Woddy, N.C. The prognosis of hyperlysinemia: An interim report. *Am J Hum Genet* 35:438-442, 1983.

da Silva, C.G., Bueno, A.R.F., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Rosa, R.B., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid *in vitro*. *Neurochem Int* 44:45–52, 2004.

Delanty, N., Dichter, M.A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand Sep* 98:145-53, 1998.

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

Delwing, D., Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., de Souza Wyse, A.T. In vivo and in vitro effects of proline on some parameters of oxidative stress in rat brain. *Brain Res* 991:180-6, 2003.

Delwing, D., Chiarani, F., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T. Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage caused by proline administration. *Neurosci Res* 52:69-74, 2005.

Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Pigatto, M., Schmitt, G.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 25:441-4, 2007.

Deon, M., Garcia, M.P., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Schmitt, G.O., Pigatto, M., Jardim, L.B., Wajner, M., Giugliani, R., Vargas, C.R. Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis* 23:43-49, 2008.

Dickinson, C.J. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci* 91:539-550, 1996.

Donaldson, J., St-Pierre, J., Minich, J., Barbeau A. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase. *Can J Biochem* 49:1217-1224, 1977.

Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M., Gassen, E., Candiago, R.H., Wilhelms, A.M., de Malfussi, H.F. 2-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate inhibit CO₂ formation from labeled substrates by rat cerebral cortex. *Biochem Soc Trans* 23:228S, 1995.

Ellaway, C.J., Wilcken, B., Christodoulou, J. Neonatology for the Generalist Clinical approach to inborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J Paediatr Child Health*. 38:511–517, 2002.

Erecinska, M., Silver, I.A. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37–71, 1994.

Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73:397–445, 2004.

Ersser, R.S., Smith, I. Aminoacids and related compounds. In: Smith, I. and

Seakins, I.W.T. Chromatographic and electrophoretic Techniques. 4th ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd, 1976.

Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388:261-266, 2001.

Feksa, L.R., Latini, A., Rech, V.C., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., de Souza Wyse, A.T., Wannmacher, C.M. Promotion of oxidative stress by L-tryptophan in cerebral cortex of rats. *Neurochem Int* 49:87-93, 2006.

Feksa, L.R., Latini, A., Rech, V.C., Feksa, P.B., Koch, G.D., Amaral, M.F., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221-233, 2008.

Fernandes, J., Saudubray, J.M., Ogier. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. 3rd ed. Berlin: Springer Verlag, 2000.

Flecknell, P.A, Cruz, I.J., Liles, J.H., Whelan, G. Induction of anaesthesia with halotone and isoflurane in the rabbit: a comparison of the use of a face-mask or an anaesthetic chamber. *Lab Anim* 30:67-74, 1996.

Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N. Ascorbate: the most effective antioxidant in the blood. *Adv Exp Med Biol* 264:155-163, 1990.

García-Cazorla, A., Rabier, D., Touati, G., Chadeaux-Vekemans, B., Marsac, C., de Lonlay, P., Saudubray, J.M. Pyruvate carboxylase deficiency: metabolic characteristics and new neurological aspects. *Ann Neurol* 59:121-127, 2006.

Ghadimi, H., Binnington, V.I., Pecora, P. Hyperlysinemia associated with retardation. *N Engl J Med* 273:723, 1965.

Geering, K. Subunit assembly and functional maturation of Na⁺, K⁺-ATPase. *J Membrane Biol* 155:109-121, 1990.

Giacobini, E., Nomura, Y., Schmidt-Glenewinkel, T. Pipecolic acid: Origin, biosynthesis and metabolism in rat brain. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol* 26:135-146, 1980.

Grisar, T. Glial and neuronal Na⁺,K⁺ pump in epilepsy. *Ann Neurol* 16:S128–S134, 1984.

Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., Schapira, A.H. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385-389, 1996.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen radicals and nervous system. *Trends Neurosci* 8:22-26, 1996.

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs and Aging* 18:685-716, 2001.

Halliwell, B., Gutteridge, M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc., 2007.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Antioxidant defences. Em: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., editores. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, pp. 79–185, 2007a.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. Em: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., editores. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, pp. 187–267, 2007b.

Hitschke, K., Bühler, R., Apell, H. J., Stark, G. Inactivation of the Na⁺, K⁺-ATPase by radiation-induced free radical-chain mechanism. *FEBS Lett* 353:297-300, 1994.

Hoffmann, G.F. Cerebral organic acid disorders and other disorders of lysine catabolism. Em: Fernandes, J., Saudubray, J-M., van den Berghe, G., Walter, J.H. (Eds) *Inborn Metabolic Diseases*. Springer, Heidelberg, pp. 293-306, 2006.

Hughes, B.P. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597–603, 1962.

Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M.B.H., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zochiling, R., Boissl, K.W., Reichmann, H. Unaltered aconitase activity but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 169:126-128, 1994.

Jones, D.H., Matus, A.I. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation–sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 356:276–287, 1974.

Joseph, M.H., Marsden, C.A. Aminoacids and small peptides. Em: Lim, C.K., editor. *HPLC of small molecules*. 1a ed. Oxford, pp. 13-28, 1986.

Kamboj, S.S., Chopra, K., Sandhir, R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzymes: beneficial effect of N-acetylcysteine supplementation. *Neurosci* 162:349–358, 2009.

Kamoun, P., Richard, V., Rabier, D., Saudubray, J.M. Plasma lysine concentration and availability of 2-cetoglutarato in liver mitochondria. *J Inherit Metab Dis* 25:1-6, 2002.

Kessler, A., Biasibetti, M., da Silva Melo, D.A., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D. Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats. *Neurochem Res* 33:737-744, 2008.

Kimmelberg H., Pahadjopoulos, D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na+K+)-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 249:1071–1080, 1974.

Kowaltowsky, A.J., Vercesi, A.E., Castilho, R.F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca²⁺: correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1318:395-402, 1997.

Kroemer, G., Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-9, 2000.

Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibition, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 120:159-162, 1990.

Lees, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci* 54:287–322, 1993.

Lees, G.J., Leong, W. The sodium–potassium ATPase inhibitor ouabain is neurotoxic in the rat substantia nigra and striatum. *Neurosci Lett* 188:113–116, 1995.

Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biochem Chem* 269:196599-196662, 1994.

Latini, A., Scussiato, K., Leipnitz, G., Gibson, K.M., Wajner, M. Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice. *J Inherit Metab Dis* 30:800-810, 2007.

Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A. The neurotoxicity of ouabain, a sodium–potassium ATPase inhibitor in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 120:159–162, 1990.

Leong, S.F., Clark, J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem J* 218:131–138, 1984.

Lovell, M.A., Xie, C., Markesbery, W.R. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855:116-123, 2000.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275, 1951.

Manos, P., Bryan, G.K., Edmond, J. Creatine kinase activity in postnatal rat brain development and in cultured neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *J Neurochem* 56:2101-7, 1991.

Matthews, R.T., Yang, L.C., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Rosen, B.R., Kaddurah-Daouk, R., Beal, M.F. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156–163, 1998.

Marin-Valencia, I., Roe, C.R., Pascual, J.M. Pyruvate carboxylase deficiency: mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol Genet Metab* 101:9-17, 2010.

Markovitz, P.J., Chuang, D.T., Cox, R.P. Familial hyperlysinemias. Purification and characterization of the bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase activities. *J Biol Chem* 259:11643-11646, 1984.

Markesbery, W.R., Carney, J.M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133-146, 1999.

Marklund, S.L. Pyrogallol autoxidation. In *Handbook for oxygen radical research*, Boca Raton, FL: CRC Press, pp 243–247, 1985.

Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C. M. *Basic Medical Biochemistry, A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

Martin, M., Macias, M., Escames, G., León, J., Acuña-Castroviejo, D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 14:1677–1679, 2000.

Mazzanti, L., Rabini, R.A., Biagini, G., Pugnali, A., de Pirro, R., Faloi, E., Mancini, V., Romanini, C., Cester, N. Changes in membrane fluidity and Na⁺/K⁺-ATPase activity during human trophoblast cell culture. *Eur J Biochem* 206:881-885, 1992.

Maxwell, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, pp. 345-361, 1995.

Molloy, G.R., Wilson, C.D., Benfield, P., de Vellis, J., Kumar, S. Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. *J Neurochem* 59:1925-32, 1992.

Moraes, T.B., Zanin, F., da Rosa, A., de Oliveira, A., Coelho, J., Petrillo, F., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292:89-95, 2010.

Nyhan, W.L., Ozand, P.T. *Atlas of Metabolic Diseases*. Chapman and Hall, London, pp 76-78, 1998.

Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H., Yhlen, B., Anggard, E.E., Halliwell, B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:734-740, 1999.

Niizuma, K., Endo, H., Chan, P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* 109:133-8, 2009.

Papes, F., Surpili, M.J., Langone, F., Trigo, J.R., Arruda, P. The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Lett* 488:34-38, 2001.

Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in Stereotaxic Coordinates. 2^o ed. Sydney: Academic Press, 1986.

Przyrembel, H., Blau, N., Duran, M., Blaskovics, M., Gibson, K.M. Disorders of ornithine, lysine and tryptophan. Physician's guide to the laboratory diagnosis of inherited metabolic disease. 2002.

Rao, V.V., Pan, X., Chang, Y.F. Developmental changes of L-lysine-ketoglutarate reductase in rat brain and liver. *Comp Biochem Physiol B* 103:221-224, 1992.

Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuña-Castroviejo, D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18:1-11, 1995.

Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Pappolla, M.A., Acuña-Castroviejo, D. Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 825:70-78, 1997.

Ribeiro, C.A., Grando, V., Dutra Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J Neurochem* 99:1531-42, 2006.

Ribeiro, C.A.J., Leipnitz, G., Amaral, A.U., de Bortoli, G., Seminotti, B., Wajner, M. Creatine administration prevents Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by intracerebroventricular administration of isovaleric acid in cerebral cortex of young rats. *Brain Research* 1262:81-88, 2009.

Ribeiro, C.A.J., Balestro, F., Grando, V., Wajner, M. Isovaleric acid reduces

Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell and Mol Neurobiol* 27:529-540, 2007.

Roede, J.R., Jones, D.P. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen* 51:380-90, 2010.

Rustin, P., Rötig, A. Inborn errors of complex II—unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1553:117–122, 2002.

Sacksteder, K.A., Biery, B.J., Morell, J.C. Identification of the α -amino adipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia. *Am J Hum Genet* 66:1736-1743, 2000.

Satoh, E., Nakazato, Y. On the mechanism of ouabain-induced release of acetylcholine from synaptosomes. *J Neurochem* 58:1038–1044, 1992.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clarck, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:1269–1276, 1989.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clarck, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochemistry* 54:823-827, 1990a.

Schapira, A.H.V., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clarck, J.B., Marsden, C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ10 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochemistry* 55:2142-2145, 1990b.

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

Seminotti, B., Leipnitz, G., Amaral, A.U., Fernandes, C.G., da Silva, L.B., Tonin, A.M., Vargas, C.R., Wajner, M. Lysine induces lipid and protein damage and decreases reduced glutathione concentrations in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:693–698,

2008.

Sestili, P., Martinelli, C., Bravi, G., Piccoli, G., Curci, R., Battistelli, M., Falcieri, E., Agostini, D., Gioacchini, A.M., Stocchi, V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Rad Biol Med* 40:837–849, 2006.

Seymour, C.A., Cockburn, F., Thomason, M.J., Littlejohns, P., Chalmers, R.A., Lord, J., Addison, G.M., Wilcox, A.H., Bain, M.D. Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. *Health Technology Assessment*. Vol. 1: No. 11, 1997.

Sies, H. Oxidative stress: introductory remarks. Em: SIES, H., ed. *Oxidative Stress*. London: Academic Press. 1985.

Sigala, F., Theocharis, S., Sigalas, K., Markantonis-Kyrouridis, S., Papalabros, E., Triantafyllou, A., Kostopanagiotou, G., Andreadou, I. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *J Pineal Res* 40:270–279, 2006.

Sinclair, L.A. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem* 19:314-321, 1982.

Singh, P., Jain, A., Kaur, G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: Correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 260:153-159, 2004.

Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., Terroso, T., Pires, R., Giugliani, R., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Vargas, C.R. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21:287-296, 2006.

Sitta, A., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Manfredini, V., de Oliveira, A.B., Wayhs, C.A., Ribas, G.O., Giugliani, L., Schwartz, I.V., Bohrer, D., Garcia, S.C., Wajner, M.,

Vargas, C.R. Evidence that L: -Carnitine and Selenium Supplementation Reduces Oxidative Stress in Phenylketonuric Patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2010.

Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10540-10543, 1991.

Smith, Q.R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood–brain barrier, *J Nutr* 130:1016S–1022S, 2000.

Soboll, S., Brdiczka, D., Jahnke, D., Schmidt, A., Schlattner, U., Wendt, S., Wyss, M., Wallimann, T. Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 31:857-66, 1999.

Southorn, P.A., Powis, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 63:381-389, 1988.

Steenweg, M.E., Salomons, G.S., Yapici, Z., Uziel, G., Scalais, E., Zafeiriou, D.I., Ruiz-Falco, M.L., Mejaski-Bosnjak, V., Augoustides-Savvopoulou, P., Wajner, M., Walter, J., Verhoeven-Duif, N.M., Struys, E.A., Jakobs, C., van der Knaap, M.S. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: pattern of MR imaging abnormalities in 56 patients. *Radiology* 251:856-65, 2009.

Tein I, Elpeleg O., Ben-Zeev B., Korman S.H., Lossos A., Lev D., Lerman-Sagie T., Leshinsky-Silver E., Vocklev J., Berry G.T., Lamhonwah A.M., Matern D., Roe C.R., Gregersen N. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab* 93:179-189, 2008.

Tonin, A.M., Ferreira, G.C., Schuck, P.F., Viegas, C.M., Zanatta, A., Leipnitz, G., Seminotti, B., Duvall Wannmacher, C.M., Wajner, M. Inhibition of creatine kinase activity by lysine in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24:349–360, 2009.

Tsakiris, S., Deliconstantinos, G. Influence of phosphatidylserine on (Na⁺,K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem J* 220:301–307, 1984.

Tsakiris, S., Angelogianni, P., Schulpis, K., Behrakis, P. Protective effect of L-cysteine and glutathione on rat brain Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by free radicals. *Z Naturforsch* 55:271-277, 2000.

van Maldegem B.T., Duran M., Wanders R.J., Niezen-Koning K.E., Hogeveen M., Ijlst L., Waterham H.R., Wijburg F.A. Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *JAMA* 296:943-952, 2006.

Viegas, C.M., Busanello, E.N., Tonin, A.M., de Moura, A.P., Grings, M., Ritter, L., Schuck, P.F., Ferreira, G.da C., Sitta, A., Vargas, C.R., Wajner, M. Dual mechanism of brain damage induced in vivo by the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome. *Brain Res* 1369:235-44, 2010.

Ward, R.J., Peters, T.J. Free Radicals. Em: Marshall, W.J., Bangert, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone, pp. 765-777, 1995.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77:325-332, 1981.

Wheeler, K.P., Walker, J.A., Barker, D.M. Lipid requirement of membrane Na⁺,K⁺-dependent adenosine triphosphate system. *Biochem J* 146:713–722, 1975.

Whittan, R. The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem J* 82:205-212, 1962.

Wyse, A.T.S., Zugno, A.I., Streck, E.L., , Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res* 27:1685–1689, 2002.

Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213, 2000.

Woody, N.C. Hyperlysinemia. *Am J Dis Child* 108:543–553, 1964.

Yagi, K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108:107-110, 1998.

Zaleska, M.M., Floyd, R.A. Regional lipid peroxidation in rat brain: possible role of endogenous iron. *Neurochem Res* 10:397-410, 1985.

Yousef, M.I., El Hendy, H.A., El-Demesdash, F.M., Elagamy, E.I. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the level of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology* 175:223–234, 2002.

Zinnanti, W.J., Lazovic, J. Mouse model of encephalopathy and novel treatment strategies with substrate competition in glutaric aciduria type I. *Mol Genet Metab* 100:88-91, 2010.

Zugno, A.I., Stefanello, F.M., Scherer, E.B., Mattos, C., Pederzolli, C.D., Andrade, V.M., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochem Res* 33: 1804-1810, 2008.

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Efeito da administração de lisina (Lis) sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ acetato (função do ciclo do ácido cítrico - CAC) em estriado de ratos.....	40
Tabela II – Efeito da administração de lisina (Lis) sobre a atividade da creatina quinase (CK) em estriado de ratos.....	41
Tabela III – Efeito da administração de lisina (Lis) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila em estriado de ratos.....	51
Tabela IV – Efeito da administração intraestriatal de lisina (Lis) sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) em estriado de ratos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota de degradação da lisina.....	7
Figura 2 – Via da sacaropina.....	8
Figura 3 – Via do ácido pipercolico.....	9
Figura 4. Reação catalisada pela creatina quinase (CK)	16

Figura 5. Função do sistema Cr/CK/PCr na difusão dos grupamentos fosfato e no tamponamento dos níveis de ATP junto aos sítios de consumo	17
Figura 6. Transporte transmembrana de íons realizado pela enzima Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	19
Figura 7. Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de lisina (Lis) sobre a atividade da enzima Na ⁺ ,K ⁺ ATPase de membranas plasmáticas sinápticas em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	42
Figura 8. Efeito da melatonina (A), combinação de α-tocoferol com ascorbato (B), creatina (C) e N-acetilcisteína (D) sobre a diminuição da atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase causada pela administração intraestriatal de lisina.....	44
Figura 9. Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de lisina (Lis) sobre a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção.....	45
Figura 10. E Efeito da melatonina (A), α-tocoferol mais ascorbato (B) e creatina (C) no aumento das substâncias reativas ao ácido-tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela administração intraestriatal de lisina 2 h após a injeção	47
Figura 11. Efeito da administração intraestriatal (I.E.) de lisina (Lis) sobre os níveis de glutaciona reduzida (GSH) em estriado de ratos jovens 30 minutos, 2 e 12 horas após a injeção	48
Figura 12. Efeito da melatonina (A), α-tocoferol mais ascorbato (B) e creatina (C) sobre a diminuição dos níveis de glutaciona reduzida (GSH) causada pela injeção intraestriatal de lisina (Lis, 4 μmol).....	50