

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –  
BIOQUÍMICA**

**EFEITO *IN VITRO* DOS ÁCIDOS 2-METILACETOACÉTICO E  
2-METIL-3-HIDROXIBUTÍRICO SOBRE ALGUNS  
PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM  
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

**RAFAEL BORBA ROSA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Dissertação 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, 2004**

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria,  
daquele que adquiriu a inteligência,  
porque mais vale este lucro que o da prata,  
e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro”.

(Provérbios 3. 13-14)

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e à UFRGS por me proporcionar uma formação gratuita e de alta qualidade.

Aos colegas do grande grupo de Erros Inatos do Metabolismo pela ajuda e excelente convivência.

Ao pessoal do Departamento de Genética Médica - HCPA pelo companheirismo, cooperação e amizade.

Aos Professores Angela Wyse e Carlos Severo Dutra-Filho pelos ensinamentos, amizade e “bons fluidos”.

Ao Professor Clóvis Wannmacher por sua ajuda no campo da ciência e por sua infinita paciência e bom humor para lidar com as pessoas.

Ao Professor Diogo de Souza e aos integrantes do seu grupo, Lisiane Porciúncula, Marcos Frizzo, Ana Maria Brusque e Gabriele Ghisleni, por toda a ajuda e companheirismo.

Ao Professor Marcos Perry e seu grupo, pela acolhida em seu laboratório, pela grande ajuda e ausência de “parcimônia” na amizade, divertimento e ensinamentos.

Às minhas eternas colegas e amigas Carol e Ângela e à “Professora” Raquel (Lab 36) pela amizade e alegria de ajudar e conviver.

Às bolsistas de iniciação científica Rita, Karina Scussiato, Vanessa e Carol pelo companheirismo, ótima convivência e ajuda.

Aos colegas de pós-graduação Cleide, Vânia, Alethéa, Letícia, Vilson e Gustavo pela amizade, companheirismo, ajuda e ótima convivência.

Aos quatro mosqueteiros: Prof. Dr. Orientador Júnior César por sua amizade e disponibilidade em ajudar a todos, ao “Manézinho” Guilhian pela alegria que sua presença irradia, à Karina Dalcin pela grande ajuda, austeridade e amizade e à Patrícia Schuck “minha maninha” por sua imensa ajuda, amizade e exemplo de dedicação e garra.

Ao “parceirão” Dênis de Assis por sua grande amizade e pela imensa ajuda nos momentos finais deste trabalho.

À Alexandra Latini que, apesar de viver “chateada” comigo, foi indispensável para a realização deste trabalho por sua ajuda, amizade e extrema competência em tudo o que faz.

Ao Mestre, Orientador e Amigo Professor Moacir Wajner por tudo o que sempre fez por mim e por todos seus alunos com grande paixão e entusiasmo.

À minha família, base do meu caráter, por tudo o que representa e sempre vai representar para mim e àqueles que já partiram, mas que com toda certeza, estão sempre comigo, guiando meus passos e me protegendo por onde quer que eu ande.

À minha mãe, irmãs e sobrinho pelo infinito amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha “Kerida” Michele. Hoje tenho certeza de que “mesmo que a gente ande por caminhos muito diferentes, um ande para trás e o outro para frente, no fim é do teu lado que eu quero ficar”. Obrigado por tudo, te amo.

## RESUMO

As deficiências da  $\beta$ -cetotiolase mitocondrial e da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD) são erros inatos do catabolismo da isoleucina. Os pacientes afetados pela deficiência da  $\beta$ -cetotiolase apresentam crises agudas de cetose e acidose metabólica, podendo apresentar convulsões que podem evoluir ao coma e morte. Bioquimicamente, são caracterizados por excreção urinária aumentada de ácido 2-metilacetoacético (MAA), 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) e tiglicina (TG). Alguns indivíduos apresentam acidemia láctica durante as crises de descompensação metabólica. Por outro lado, os indivíduos afetados pela deficiência da MHBD são caracterizados por retardo mental, convulsões e acidose láctica severa, apresentando excreção urinária aumentada de MHB e TG. O aumento do ácido láctico em ambas as enfermidades sugere um comprometimento do metabolismo energético.

Tendo em vista que os mecanismos fisiopatogênicos de ambas as desordens são totalmente desconhecidos e que os achados bioquímicos sugerem um déficit na produção de energia dos pacientes, o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* do MAA e do MHB sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Nossos resultados demonstraram que o MAA inibiu a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose, acetato e citrato, indicando um bloqueio do ciclo do ácido cítrico. Em adição, o complexo II da cadeia respiratória bem como a enzima succinato desidrogenase foram inibidos na presença do MAA. Portanto, é possível que a inibição da cadeia respiratória tenha levado à inibição secundária do ciclo de Krebs.

As enzimas Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e creatina quinase (CK) não foram afetadas pelo MAA. O MHB inibiu a produção de CO<sub>2</sub> a partir dos três substratos testados bem como o complexo IV da cadeia respiratória, sugerindo que a inibição da cadeia respiratória tenha levado à inibição da produção CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs. A enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase não foi afetada pelo ácido. No entanto, o MHB inibiu a atividade total da CK às custas da CK mitocondrial (mi-CK). A presença do inibidor da enzima óxido nítrico sintase L-NAME e do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) preveniram a inibição da atividade total da CK, enquanto que a GSH preveniu a inibição da mi-CK, sugerindo que os efeitos do MHB sobre a CK estejam relacionados à oxidação de grupamentos tióis essenciais à atividade enzimática.

Tais resultados sugerem que o metabolismo energético cerebral é inibido *in vitro* pelo MAA e pelo MHB. Caso estes achados se confirmem nas deficiências da β-cetotiolase e da MHBD, é possível que um prejuízo no metabolismo energético causado pelo acúmulo destes metabólitos possa explicar, ao menos em parte, o dano neurológico encontrado nos pacientes portadores destas doenças.

## ABSTRACT

Mitochondrial  $\beta$ -ketothiolase and 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (MHBD) deficiencies are inherited neurometabolic disorders affecting isoleucine catabolism. Patients affected by  $\beta$ -ketothiolase deficiency present normal early development followed by a progressive loss of mental and motor skills, convulsions, coma and death. Biochemically,  $\beta$ -ketothiolase deficiency is characterized by intermittent ketoacidosis and urinary excretion of 2-methylacetoacetate (MAA), 2-methyl-3-hydroxybutyrate (MHB) and tiglylglycine (TG). In addition, some patients may present lactic acidemia during crises. On the other hand, patients affected by MHBD deficiency manifest mental retardation, convulsions and severe lactic acidosis accompanied by increased urinary excretion of MHB and TG. The increased lactic acid in both diseases suggests the involvement of a deficient energetic metabolism.

Considering that the fisiopathologic mechanisms of the neurological alterations of these disorders are unknown and that the biochemical findings suggest an impairment of energy production, the objective of the present work was to investigate the *in vitro* effect of MAA and MHB on several parameters of energetic metabolism in cerebral cortex from young rats.

Our results demonstrated that MAA inhibited CO<sub>2</sub> production when glucose, acetate and citrate were used as substrates. In addition, respiratory chain complex II and succinate dehydrogenase activities were inhibited by MAA. Moreover, the activities of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and creatine kinase (CK) were not modified by MAA. Similarly, MHB inhibited CO<sub>2</sub> production from all the tested substrates, inhibited the

respiratory chain activity by diminishing the complex IV activity and did not modify the activity of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. These results indicate a blockage in the Krebs cycle which could be provoked by the respiratory chain inhibition observed for both metabolites. Furthermore, MHB specifically inhibited total CK activity by reducing mitochondrial CK. Total and mitochondrial CK activities were prevented by the use of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME and glutathione (GSH) indicating that CK inhibition could be related to the oxidation of essential enzyme thiols.

Taking together, these *in vitro* results suggest that the brain energetic metabolism may be inhibited by MAA and MHB. Finally, if the effects detected in this study also occur *in vivo*, it is tempting to speculate that they may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction found in  $\beta$ -ketothiolase and MHBD deficiencies.



## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Catabolismo da isoleucina.....	21
Figura I.2. Deficiência da $\beta$ -cetotilase.....	23
Figura I.3. Função da $\beta$ -cetotilase no metabolismo da isoleucina e corpos cetônicos.....	24
Figura I.4. Deficiência da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase.....	31
Figura I.5. Fluxo de elétrons através da cadeia respiratória.....	37
Figura I.6. Reação catalisada pela creatina quinase.....	41
Figura I.7. Função do sistema Cr/CK/PCr.....	44
Figura IV.1. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	61
Figura IV.2. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	62
Figura IV.3. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	63
Figura IV.4. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	65
Figura IV.5. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	66
Figura IV.6. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	67
Figura IV.7. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	68
Figura IV.8. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	69
Figura IV.9. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	71

Figura IV.10. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade total da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	73
Figura IV.11. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	75
Figura IV.12. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	76
Figura IV.13. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	77
Figura IV.14. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	79
Figura IV.15. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	80
Figura IV.16. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	81
Figura IV.17. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	82
Figura IV.18. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	83
Figura IV.19. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	85
Figura IV.20. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade total da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	87
Figura IV.21. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase citosólica (cy-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	88
Figura IV.22. Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial (mi-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	89
Figura IV.23. Efeito <i>in vitro</i> da glutatona reduzida (GSH) e do N <sup>o</sup> -nitro-L-argininametiléster (L-NAME) sobre o efeito inibitório do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade total da creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	90

Figura IV.24. Efeito *in vitro* da glutathiona reduzida (GSH) sobre o efeito inibitório do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial (mi-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens..... 91

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – difosfato de adenosina
- ANOVA – análise de variância de uma via
- ATP – trifosfato de adenosina
- CG – cromatografia gasosa
- CK – creatina quinase
- CK total – creatina quinase total
- CoA – coenzima A
- COX – citocromo *c* oxidase
- Cr – creatina
- cy-CK – creatina quinase citosólica
- Cys – cisteína
- DCIP – dicloroindofenol
- EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético
- EIM – erros inatos do metabolismo
- EM – espectrometria de massa
- ETF – flavoproteína transferidora de elétrons
- FAD – flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
- FADH<sub>2</sub> – flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- GSH – glutatona reduzida
- HEPES – ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano sulfônico
- L-NAME – N<sup>o</sup>-nitro-L-argininametiléster
- MAA – ácido 2-metilacetoacético

- MAA-CoA – 2-metilacetoacetil-CoA
- MHB – ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico
- MHBD – 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase
- mi-CK – creatina quinase mitocondrial
- NAD<sup>+</sup> – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
- NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- PCr – fosfocreatina
- pHMB – ácido p-hidroxi-mercuribenzoico (pHMB)
- Pi – fosfato inorgânico
- PMS – metassulfato de fenazina
- SDH – succinato desidrogenase
- SNC – sistema nervoso central
- T2 – 2-metilacetoacetil-CoA tiolase ( $\beta$ -cetotiolase)
- TCA – ácido tricloroacético
- TG – tiglilglicina

# SUMÁRIO

<b>I Introdução.....</b>	<b>17</b>
I. 1 Erros inatos do metabolismo.....	17
I. 1. 1 Acidemias orgânicas.....	18
I. 2 Catabolismo da isoleucina.....	19
I. 2. 1 Deficiência da 2-metilacetoacetil-CoA tiosulfoxidase.....	22
I. 2. 1. 1 Diagnóstico.....	25
I. 2. 1. 2 Tratamento.....	28
I. 2. 2 Deficiência da 2-metil-3-hidroxiisovaleryl-CoA desidrogenase.....	28
I. 2. 2. 1 Diagnóstico.....	32
I. 2. 2. 2 Tratamento.....	32
I. 3 Metabolismo intermediário no cérebro de mamíferos.....	33
I. 4 Fosforilação oxidativa.....	34
I. 5 Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	38
I. 6 Creatina quinase.....	40
<b>II Objetivos.....</b>	<b>45</b>
II. 1 Objetivos específicos.....	45
<b>III Material e Métodos.....</b>	<b>46</b>
III. 1 Reagentes.....	46
III. 1. 1 Reagentes utilizados.....	46
III. 2 Equipamentos e outros materiais.....	48
III. 3 Animais.....	49
III. 4 Produção de CO <sub>2</sub> por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	50
III. 4. 1 Preparação do tecido.....	50
III. 4. 2 Captação de CO <sub>2</sub> .....	50
III. 5 Determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	51

III. 5. 1	Preparação do tecido.....	52
III. 5. 2	Determinação da quantidade de proteína.....	52
III. 5. 3	Determinação da atividade do complexo I-III (NADH: citocromo <i>c</i> oxirredutase)....	52
III. 5. 4	Determinação da atividade do complexo II (succinato: DCIP oxirredutase) e succinato desidrogenase (SDH).....	53
III. 5. 5	Determinação da atividade do complexo II-III (succinato: citocromo <i>c</i> oxirredutase).....	53
III. 5. 6	Determinação da atividade do complexo IV (citocromo <i>c</i> oxidase).....	54
III. 6	Determinação da atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	54
III. 6. 1	Preparação de membranas plasmáticas sinápticas.....	54
III. 6. 2	Determinação da quantidade de proteína.....	55
III. 6. 3	Determinação da atividade enzimática.....	56
III. 7	Determinação da atividade da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	56
III. 7. 1	Preparação das amostras.....	57
III. 7. 2	Determinação da quantidade de proteína.....	57
III. 7. 3	Determinação da atividade enzimática.....	58
III. 8	Análise estatística.....	59
<b>IV</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>60</b>
IV. 1	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.....	60
IV. 1. 1	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	60
IV. 1. 2	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	64
IV. 1. 3	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	70
IV. 1. 4	Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade total da creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	72

IV. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.....	74
IV. 2. 1 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	74
IV. 2. 2 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	78
IV. 2. 3 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.....	84
IV. 2. 4 Efeito <i>in vitro</i> do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre as atividades da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.....	86
<b>V Discussão.....</b>	<b>92</b>
<b>VI Conclusões.....</b>	<b>100</b>
<b>VII Referências Bibliográficas.....</b>	<b>102</b>



# I INTRODUÇÃO

## I. 1 Erros Inatos do Metabolismo

A primeira menção ao termo erros inatos do metabolismo (EIM) data de 1908 e foi feita por Archibald Garrod em seus estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou que freqüentemente um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que essa substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Mais tarde, verificou-se o acúmulo de outras substâncias na urina e tecidos de pacientes e sua relação com alterações genéticas. Observou-se também, que tais alterações resultavam na síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não (SCRIVER et al., 2001).

Até o momento, foram descritos mais de 450 erros inatos do metabolismo, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (SCRIVER et al., 2001).

### **I. 1. 1 Acidemias orgânicas**

As acidemias ou acidúrias orgânicas são erros inatos do metabolismo nos quais um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de uma enzima do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (CHALMERS e LAWSON, 1982). Vários ácidos orgânicos estão presentes no sangue e na urina de indivíduos normais, porém em concentrações reduzidas. Nos pacientes com estes distúrbios, estes ácidos encontram-se em altas concentrações no sangue e, principalmente, na urina.

A freqüência destas doenças na população em geral é pouco conhecida, talvez devido ao desconhecimento pela maioria dos médicos da existência das mesmas e da falta de laboratórios especializados para o seu diagnóstico. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo, a incidência destas doenças é estimada em 1: 2.200 recém-nascidos, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1: 6.000 recém-nascidos (HOFFMANN, 1994). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consangüinidade é elevada, a freqüência é de 1: 740 nascidos vivos (RASHED et al., 1994).

No início da década de 80 foi demonstrado que estes distúrbios eram os erros inatos do metabolismo mais freqüentes em crianças hospitalizadas (CHALMERS et al., 1980), o que motivou maiores estudos clínico/laboratoriais e epidemiológicos nos anos que se seguiram.

Clinicamente os pacientes afetados apresentam, como sintomatologia mais comum, a disfunção neurológica em suas mais diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatetóticos, tetraparesia espástica, atraso no

desenvolvimento psicomotor, etc. As mais freqüentes manifestações são cheiro peculiar na urina e/ou suor, cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidose láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres e outros (SCRIVER et al., 2001). Recentemente, com o uso da tomografia computadorizada, foram encontradas em alguns pacientes afetados por essas doenças alterações de substância branca (hipomielização e/ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou dos gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar (MAYATEPEK et al., 1996).

## **I. 2 Catabolismo da isoleucina**

A rota normal para o catabolismo da isoleucina ocorre na mitocôndria via intermediários com a configuração estereoquímica S (figura I.1), porém, a isomerização do ácido 2-ceto-3-metilvalérico à sua forma R conduz o metabolismo a uma rota secundária de menor importância em indivíduos normais (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001).

O primeiro passo da degradação da isoleucina é sua transaminação ao seu cetoácido correspondente (ácido 2-ceto-3-metilvalérico). A ausência desta transaminase específica dos aminoácidos de cadeia ramificada no fígado faz com que a isoleucina seja oxidada primariamente em tecidos extrahepáticos (músculos, adipócitos, rins e cérebro) (NELSON e COX, 2000a). Na presença da coenzima A (CoA), o cetoácido é degradado a 2-metilbutiril-CoA o qual é novamente oxidado, por ação de outra desidrogenase, a tigilil-CoA. Os elétrons provenientes desta última oxidação são carregados pelo FAD e transferidos ao ETF para então passarem à cadeia de transporte de elétrons. Ainda que a possibilidade de uma hidratase

específica para tiglil-CoA não tenha sido descartada, acredita-se que tiglil-CoA seja hidratada a 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA pela enzima conhecida como crotonase. A oxidação reversível de 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA a 2-metilacetoacetyl-CoA é catalisada por uma hidróxiacil-CoA desidrogenase. Esta enzima age sobre 3-hidroxiácidos de cadeia curta e média resultantes da  $\beta$ -oxidação, porém também pode agir em substratos metilados na posição 2. A 2-metilacetoacetyl-CoA tiosase mitocondrial catalisa o último passo do catabolismo da isoleucina, clivando o composto 2-metilacetoacetyl-CoA em propionil-CoA e acetyl-CoA com a utilização de uma CoA (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). A acetyl-CoA pode ser oxidada diretamente no ciclo do ácido cítrico e a propionil-CoA pode formar metilmalonil-CoA e após succinil-CoA que então entra no ciclo.

A isoleucina é, portanto, considerada um aminoácido cetogênico por formar corpos cetônicos a partir de acetyl-CoA e, também, gliconeogênico, por poder originar glicose através de precursores provenientes do ciclo do ácido cítrico (succinil-CoA) (NELSON e COX, 2000a).

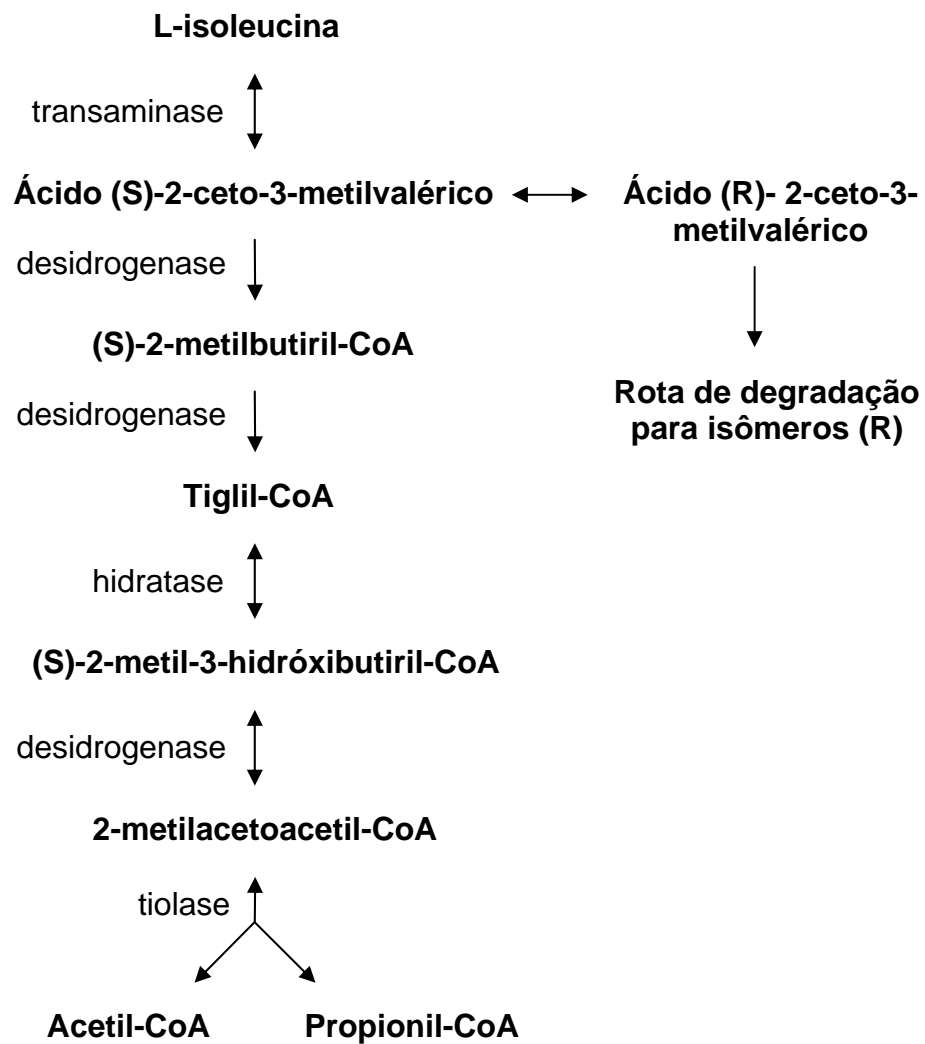


Figura I.1. Catabolismo da isoleucina (adaptado de SWEETMAN e WILLIAMS, 2001).

### **I. 2. 1 Deficiência da 2-metilacetoacetil-CoA tiolase**

A deficiência da 2-metilacetoacetil-CoA tiolase mitocondrial (T2) (EC 2. 3. 1. 9) (figura I.2), também conhecida como deficiência da  $\beta$ -cetotiolase é considerada um erro inato do metabolismo da isoleucina e de corpos cetônicos (DAUM et al., 1971) de transmissão autossômica recessiva (MITCHELL e FUKAO, 2001).

Existem no mínimo cinco cetotiolases em mamíferos, três mitocondriais, uma citosólica e uma peroxissomal (MIDDLETON, 1973; MIYASAWA et al., 1980; UCHIDA et al., 1992). Uma das isoformas mitocondriais possui pouca especificidade, atuando na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa (MIDDLETON, 1973; MITCHELL e FUKAO, 2001). A enzima trifuncional da membrana interna da mitocôndria participa da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (UCHIDA et al., 1992). A tiolase citosólica, atua somente sobre acetoacetil-CoA, tendo sua distribuição associada a capacidade dos tecidos de sintetizar esteróides a partir de acetato (MIDDLETON, 1973). A enzima peroxissomal desempenha um papel importante na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (3-cetoacil-CoA) (MIDDLETON, 1973). A 2-metilacetoacetil-CoA tiolase mitocondrial (T2), única das cetotiolases ativada por  $K^+$ , hidrolisa acetoacetil-CoA e MAA-CoA (MIDDLETON e BARTLETT, 1983), desempenhando um papel chave no metabolismo da isoleucina e dos corpos cetônicos (figura I.3). No fígado, a enzima está envolvida na síntese de corpos cetônicos e não na hidrólise dos mesmos, como ocorre em tecidos extrahepáticos (MIDDLETON, 1978).

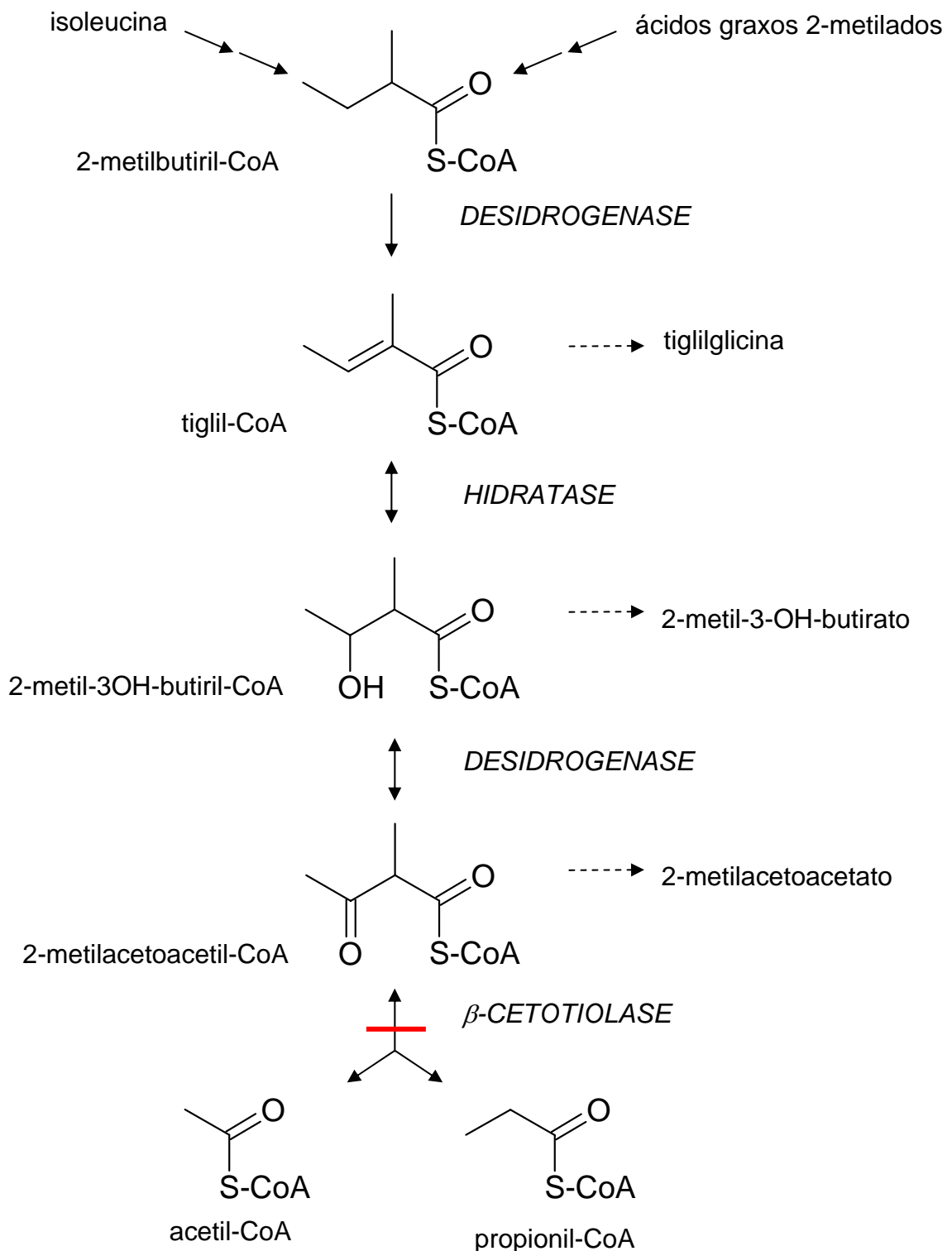


Figura I.2. Deficiência da  $\beta$ -cetotilase. O bloqueio da rota no ponto indicado gera o acúmulo de 2-metilacetoacetato, 2-metil-3-hidroxybutirato e tiglylglicina (adaptado de MITCHELL e FUKAO, 2001).

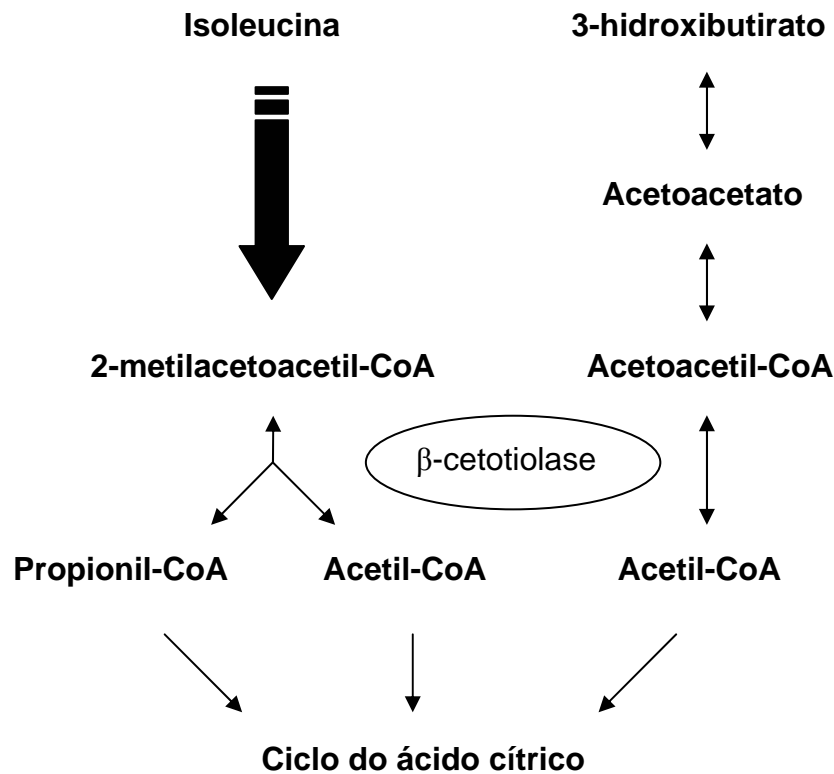


Figura I.3. Função da  $\beta$ -cetotiolase no metabolismo da isoleucina e corpos cetônicos (adaptado de SØVIK, 1993).

A apresentação clínica desta desordem é tão variável quanto o número de mutações encontradas por análise molecular (MITCHELL e FUKAO, 2001). São descritos desde indivíduos afetados com desenvolvimento normal (KREMER et al. 1997; DAUM et al., 1973) até outros com severo comprometimento físico e mental (DAUM et al., 1973; MERINERO et al., 1987). Os achados clínicos mais comuns desta doença são cetose, severa acidose metabólica, vômitos (muitas vezes com hematêmese), desidratação (causada por sucessivos episódios de diarreia), letargia evoluindo ao coma e morte (HILLMAN e KEATING, 1974; MITCHELL e FUKAO, 2001) Os pacientes usualmente apresentam crises agudas de cetoacidose, permanecendo assintomáticos no período entre estes episódios (MITCHELL e



FUKAO, 2001). Alguns pacientes são acometidos por severa enxaqueca. Retardo mental e distonia são relatados. Anormalidades nos gânglios da base similares às encontradas em aminoacidopatias têm sido descritas (MITCHELL e FUKAO, 2001). A característica bioquímica é uma excreção urinária aumentada de ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB), tigililglicina (TG) e, em alguns casos, de ácido 2-metilacetoacético (MAA) (tabela I.1) (SØVIK, 1993; MITCHELL e FUKAO, 2001).

Na maioria dos casos estudados, o primeiro episódio que conduziu o paciente à internação e possibilitou um posterior diagnóstico ocorreu entre 6 e 24 meses de idade, o que pode estar relacionado ao período em que a criança passa a se alimentar com uma dieta de conteúdo protéico maior do que a do leite materno (SØVIK, 1993).

Tabela I.1. Excreção urinária dos ácidos 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB), 2-metilacetoacético (MAA) e de tigililglicina (TG) de pacientes portadores de deficiência da  $\beta$ -cetotilase e de indivíduos normais. ND= não detectado e NF= dados não fornecidos.

	<b>MHB</b>	<b>MAA</b>	<b>TG</b>
	<b>(mmol/mol de creatinina)</b>		
<b>Pacientes</b>	100-14000	25-250	70-7000
<b>Indivíduos normais</b>	1-9	ND	NF

Fonte: MITCHELL e FUKAO (2001)

### I. 2. 1. 1 Diagnóstico

A investigação desta deficiência deve ser considerada quando a criança apresenta recorrentes episódios de cetoacidose sem apresentar, no entanto, uma cetose crônica (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). Devido à grande variabilidade no padrão de excreção dos metabólitos e da necessidade de técnicas analíticas específicas para alguns (MAA e 2-butanona), não existe um perfil quantitativo típico

bem determinado da excreção dessas substâncias (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). O diagnóstico desta doença depende da análise dos ácidos orgânicos na urina dos pacientes, realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

Ainda que o MAA seja o substrato da enzima defeituosa, ele geralmente não é o metabólito mais elevado. A sua ausência em muitas análises pode estar relacionada à sua descarboxilação não enzimática a 2-butanona, composto volátil ocasionalmente excretado (KEATING et al., 1972; DAUM et al., 1973) que também pode se formar em meio ácido durante a preparação da amostra para CG/EM (ARAMAKI et al., 1991). O metabólito mais elevado na urina desses pacientes é o MHB, resultado da reação reversa catalisada pela desidrogenase, que é ativada por uma alta razão NADH/NAD<sup>+</sup> (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). O aumento de MHB desloca o equilíbrio da reação, gerando a elevação de sua forma desidratada, a tigilil-CoA. A tigilil-CoA, por ação de uma glicina N-acilase, forma o composto tigililglicina (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). É importante salientar que a elevação isolada de MAA e, principalmente de MHB, durante episódios cetóticos não pode ser considerado diagnóstico, já que estes metabólitos podem estar aumentados em indivíduos com cetose por qualquer razão. MHB e TG também são detectados nas acidemias propiônica e metilmalônica, porém estas doenças são facilmente distinguíveis da deficiência da  $\beta$ -cetotilase pela presença de outros metabólitos característicos (MITCHELL e FUKAO, 2001). A elevação contínua de MAA e MHB entre os episódios cetóticos é fortemente sugestiva da deficiência da  $\beta$ -cetotilase mitocondrial (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001).

Considerando as dificuldades analíticas mencionadas, pode-se fazer a suplementação oral de isoleucina (100 mg/Kg de peso corporal), que resulta no

aumento de MHB, MAA e TG na urina dos indivíduos afetados (ARAMAKI et al., 1991; MITCHELL e FUKAO, 2001).

A determinação de carnitinas esterificadas também é útil no diagnóstico já que, durante as crises agudas, a relação acil-carnitina/carnitina livre encontra-se aumentada no sangue (FONTAINE et al., 1996; MITCHELL e FUKAO, 2001).

Por outro lado, diversas metodologias para a determinação da atividade da  $\beta$ -cetotiolase têm sido descritas. Gibson et al. (1992) propuseram um método para avaliar a rota de conversão de tiglil-CoA à D-metilmalonil-CoA (resultado da carboxilação da propionil-CoA). Eram medidas a taxa de conversão de tiglil-CoA a D-metilmalonil-CoA e, paralelamente, a atividade da propionil-CoA carboxilase em cultura de fibroblastos. Um aumento na razão atividade da propionil-CoA carboxilase/taxa de conversão de tiglil-CoA a D-metilmalonil-CoA é indicativo de uma deficiência nesta rota. Este método, por negligenciar a atividade de outras enzimas (tiglil-CoA hidratase e 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase) carece de especificidade e pode conduzir a falsos diagnósticos. Hiyama et al. (1986) utilizaram a ativação específica da  $\beta$ -cetotiolase mitocondrial por  $K^+$  em leucócitos para o diagnóstico desta doença. Esta ativação específica parece não ocorrer em indivíduos afetados pela doença (KREMER et al., 1997). Finalmente, o método de determinação da atividade enzimática de Middleton e Bartlett (1983), realizado em cultura de fibroblastos, e que utiliza 2-metilacetoacetil-CoA (MAA-CoA) como substrato, é um método mais sensível e específico que os descritos acima, porém a MAA-CoA é instável e comercialmente indisponível (MITCHELL e FUKAO, 2001).

As metodologias de determinação enzimática normalmente são empregadas após o diagnóstico por CG/EM, resultante da resposta do paciente à administração de isoleucina (ARAMAKI et al., 1991).

O diagnóstico molecular não é considerado um exame de primeira linha para a deficiência de  $\beta$ -cetotiolase pela grande heterogeneidade alélica apresentada. No entanto, a sua utilização no diagnóstico pré-natal tem sido relatada (MITCHELL e FUKAO, 2001).

### **I. 2. 1. 2 Tratamento**

Durante as crises agudas de acidose metabólica com cetoacidose e desidratação, a suplementação de fluidos é essencial, e a administração de álcalis (bicarbonato de sódio) pode ser necessária (SØVIK, 1993). No entanto, uma alcalinização excessiva pode conduzir a uma hipernatremia, associada à hemorragia cerebral e morte, especialmente em indivíduos portadores de uma mutação específica (MITCHELL e FUKAO, 2001). A administração de L-carnitina tem sido proposta como alternativa para diminuir a toxicidade e facilitar a excreção urinária de tigllil-CoA e outras acilas (FONTAINE et al., 1996; MITCHELL e FUKAO, 2001).

Uma dieta com restrição protéica ou de baixo conteúdo de isoleucina geralmente é recomendada (SØVIK, 1993). O aporte calórico adequado de carboidratos e a diminuição dos períodos de jejum com aumento no número de refeições são alternativas para evitar o catabolismo protéico e a cetogênese (KREMER et al., 1997).

### **I. 2. 2 Deficiência da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase**

A acidúria 2-metil-3-hidroxi-butírica foi descrita pela primeira vez por Zschocke et al. (2000), que a consideraram como um novo erro inato do metabolismo da isoleucina e dos ácidos graxos metilados na posição 2 (figura I.4). O primeiro caso da doença foi relatado em um recém-nascido do sexo masculino nascido a termo,

filho de um casal germânico sem nenhum grau de parentesco, que no segundo dia de vida desenvolveu taquidispnéia e acidose metabólica com severa hipoglicemia, concentração plasmática de lactato elevada, hiperamonemia e cetonúria. Movimentos convulsivos também foram observados. A criança se recuperou com uma infusão intravenosa de glicose. Aos dois meses de idade, uma análise de ácidos orgânicos na urina revelou uma excreção aumentada de ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) e tigililglicina (TG), o que foi interpretado como uma deficiência de  $\beta$ -cetotiolase. Ao final do primeiro ano de vida, o desenvolvimento psicomotor estava nitidamente atrasado. Aos quatorze meses, coincidindo com o período de vacinação, a criança começou a mostrar progressiva perda das habilidades motoras e visuais, agitação acentuada e movimentos coreatetóticos. Durante as semanas que se seguiram, a criança apresentou convulsões, as quais foram reduzidas com administração de vigabatrina. Estudos de ressonância cerebral revelaram uma leve atrofia frontotemporal. Aos dois anos de idade, o garoto estava severamente retardado, agitado, com marcada hipotonia e apresentava pouca reação a estímulos externos. Em vista do curso clínico grave da doença, o diagnóstico anterior foi reconsiderado e adicionais investigações foram realizadas. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) de ácidos orgânicos na urina mostrou constante elevação de MHB e TG mas não de ácido 2-metilacetoacético (MAA). Ácidos orgânicos estavam normais no plasma, porém o lactato estava repetidamente aumentado no sangue e no líquido. Após a administração de isoleucina observou-se grande elevação de MHB e TG mas nunca de MAA. A análise plasmática mostrou traços de MHB, normalmente indetectável. A atividade da enzima 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD) em fibroblastos do paciente estava virtualmente ausente enquanto que a atividade da  $\beta$ -cetotiolase revelou valores

normais. A herança dessa doença é ligada ao cromossomo X e diferentes tipos de mutações têm sido descritos (OFMAN et al., 2001). Esta doença tem largo espectro de ocorrência em homens (OLPIN et al., 2002), podendo, no entanto, se manifestar suavemente em mulheres portadoras (ENSENAUER et al., 2002).

Outro paciente, descrito por Olin et al. (2002), permaneceu assintomático durante seis anos, apresentando os primeiros sintomas de deterioração da habilidade motora após contrair sarampo. Poucos anos depois sua fala e seu modo de andar estavam totalmente deteriorados bem como o seu comportamento, que se tornou difícil e truculento. Ele foi conduzido à pesquisa de um possível distúrbio metabólico por volta dos treze anos de idade, quando a investigação em fibroblastos juntamente com um atípico curso clínico, gerou uma suspeita de um outro defeito no catabolismo da isoleucina que não uma deficiência da  $\beta$ -cetotilase, sugerida pelo padrão de excreção de metabólitos. O diagnóstico da deficiência de MHBD foi confirmado pela determinação da atividade enzimática específica. Uma atividade diminuída dos complexos da cadeia respiratória em fibroblastos foi evidenciada, sendo relatada previamente em um paciente com um defeito no catabolismo da isoleucina descrito por Burlina et al. (1998), agora confirmado como deficiência da MHBD. Este paciente apresentou um curso mais benigno suave que o do paciente descrito por Zschocke et al. (2000), provavelmente devido a uma maior atividade residual da MHBD, o que pode explicar a grande variabilidade fenotípica apresentada por esta desordem.

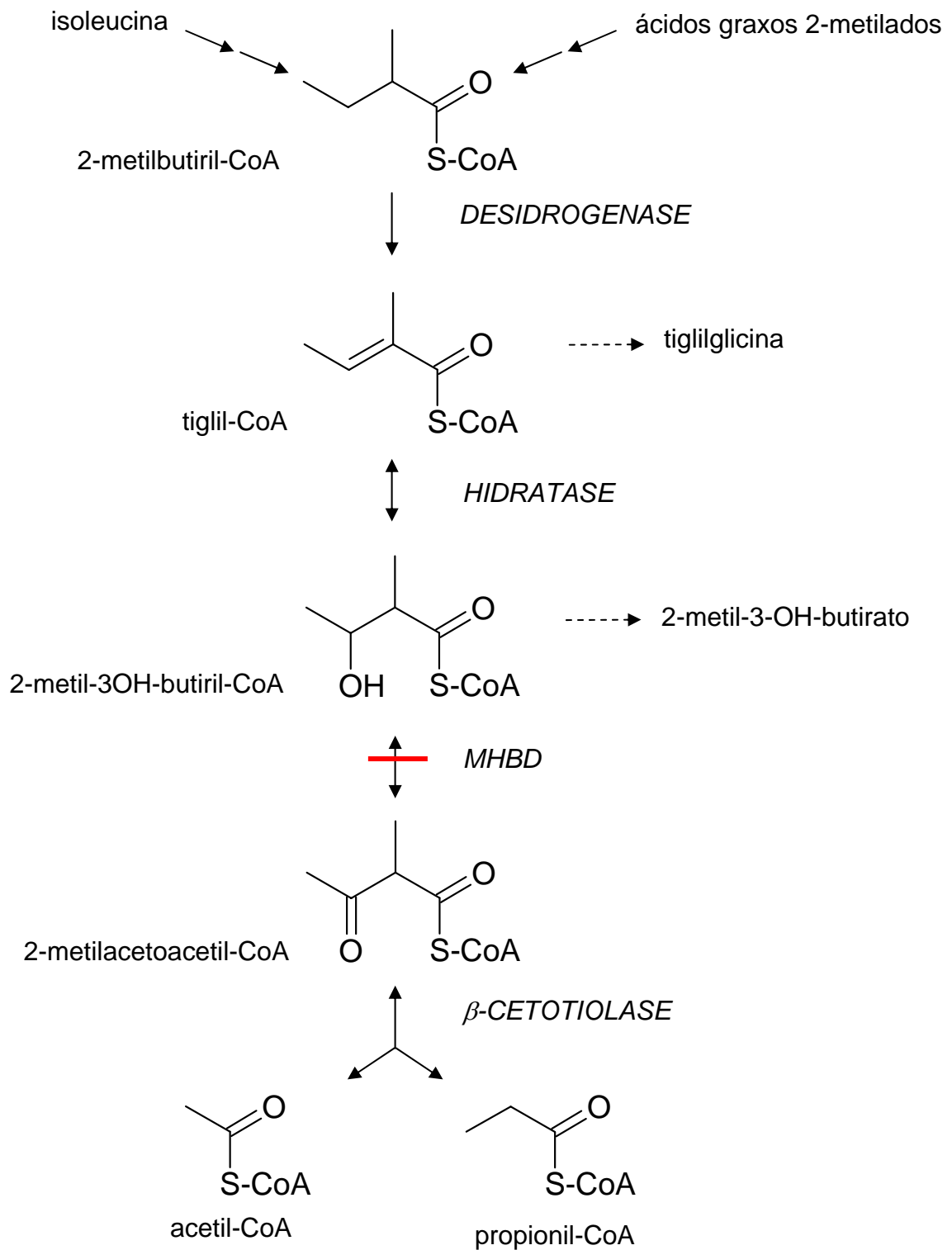


Figura I.4. Deficiência da 2-metil-3-hidróxibutiril-CoA desidrogenase (MHBD). O bloqueio da rota no ponto indicado gera o acúmulo de 2-metil-3-hidroxitirato e tiglylglicina (adaptado de MITCHELL e FUKAO, 2001).

### **I. 2. 2. 1 Diagnóstico**

O diagnóstico, assim como no caso da deficiência da  $\beta$ -cetotilase, é dado pelo padrão de excreção urinária dos metabólitos (MHB e TG) verificado por CG/EM. Pode-se fazer uso da administração de isoleucina para melhor caracterização dos ácidos na urina. A observação clínica e bioquímica do curso da doença é de extrema importância para se diferenciar da deficiência da  $\beta$ -cetotilase. A presença de ácido 2-etilhidracrílico, um metabólito de menor concentração encontrado na urina destes pacientes, é sugerido como característico da deficiência da MHBD (SUTTON et al., 2003). A deficiência da MHBD parece ser uma acidúria orgânica cuja neurotoxicidade é causada pelo acúmulo dos metabólitos enquanto a deficiência da  $\beta$ -cetotilase é uma desordem de cetólise que se apresenta preponderantemente com acidose e vômitos (SUTTON et al., 2003).

A determinação da atividade enzimática específica e a avaliação da rota de tiglil-CoA à metilmalonil-CoA, com paralela determinação da atividade da  $\beta$ -cetotilase, fazem parte do diagnóstico.

### **I. 2. 2. 2 Tratamento**

A restrição de isoleucina na dieta tem se mostrado discutível. O paciente descrito por Zschocke et al. (2000) não demonstrou adicional deterioração das funções neurológicas sob este regime. A inquietação e a frequência das convulsões também foram diminuídas com a dieta. Entretanto, esta dieta não demonstrou efeito no paciente descrito por Sutton et al. (2003). Neste caso, talvez seja necessário um tempo maior para verificar o efeito desta dieta no curso clínico da deficiência da MHBD (SUTTON et al., 2003).



### **I. 3 Metabolismo intermediário no cérebro de mamíferos**

O principal substrato energético para o cérebro de mamíferos adultos é a glicose, porém o padrão de utilização deste nutriente varia conforme a etapa de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), o estado nutricional do indivíduo e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (MARKS; MARKS e SMITH, 1996a).

Nas primeiras horas após o nascimento, o lactato é a principal fonte de obtenção de energia cerebral (VICARIO et al., 1991). Com o início do período de amamentação, os corpos cetônicos, formados a partir da oxidação dos ácidos graxos contidos no leite, são utilizados em grandes quantidades pelo cérebro. Assim, durante as primeiras semanas de desenvolvimento, os corpos cetônicos se constituem como uma das principais fontes para obtenção de energia pelo cérebro (MILLER et al., 1982). Nesta fase, o consumo de glicose pelo cérebro é reduzido, aumentando gradativamente em poucas semanas. O equilíbrio entre o consumo de glicose e corpos cetônicos é alcançado por volta dos 18 dias de vida, quando a utilização de glicose se torna preferencial em condições normais (CRONE, 1965; CREMER et al., 1976).

O estado nutricional também dita o padrão de utilização de nutrientes pelo cérebro. Situações de jejum prolongado fazem com que o SNC passe a utilizar corpos cetônicos para obtenção de energia, a fim de poupar o organismo de um catabolismo protéico exacerbado, resultante da necessidade da manutenção da glicemia via gliconeogênese (MARKS; MARKS e SMITH, 1996b).

A glicose captada pelo cérebro é fonte de carbono para a síntese de diversas outras biomoléculas (neurotransmissores por exemplo), o que reforça a idéia de que a utilização de glicose não está atrelada somente à produção de energia. Assim,

pode-se esperar que o SNC utilize diversos substratos para obtenção de energia, ligados ou não, ao metabolismo da glicose.

Como o metabolismo energético cerebral se mostra essencialmente aeróbico, independentemente do substrato utilizado (CLARK et al., 1993), a via comum de oxidação dos glicídeos, aminoácidos e ácidos graxos é o ciclo do ácido cítrico (STRYER, 1996a). A maior parte dessas moléculas entra no ciclo sob a forma de acetil-CoA, que é então oxidada a  $\text{CO}_2$ . Alguns substratos entram no ciclo através das chamadas reações anapleróticas, que alimentam o ciclo fornecendo diretamente seus intermediários (MARKS; MARKS e SMITH, 1996c).

Diversos substratos marcados por isótopos radioativos são oxidados *in vitro* pelo cérebro. A utilização dessas substâncias tem auxiliado o estudo do metabolismo energético cerebral a partir de diferentes pontos da rota aeróbica de oxidação, dependendo do substrato utilizado (glicose, acetato ou citrato por exemplo) e da posição onde a molécula é marcada.

#### **I. 4 Fosforilação Oxidativa**

Os dinucleotídeos reduzidos NADH e  $\text{FADH}_2$ , provenientes da oxidação da glicose, ácidos graxos, aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido cítrico são moléculas ricas em energia, pois contém elétrons com alto potencial de transferência (STRYER, 1996b).

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o  $\text{O}_2$  é reduzido à  $\text{H}_2\text{O}$ , por elétrons doados pelo NADH e  $\text{FADH}_2$ , que fluem por vários pares redox (cadeia respiratória) ocorrendo concomitante produção de ATP a partir de ADP e Pi (NELSON e COX, 2000b). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas

mitocôndrias, mais precisamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia produzida pela célula (figura 1.5).

As mitocôndrias são corpúsculos envolvidos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons  $H^+$  (NELSON e COX, 2000b). A membrana interna contém transportadores específicos para a passagem de substâncias como o piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (ABELES, FREY e JENCKS, 1992). O fluxo de elétrons do NADH e  $FADH_2$  até o  $O_2$  se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna. Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre NADH e  $FADH_2$ , complexos enzimáticos e o  $O_2$ , acceptor final da cadeia respiratória.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q ou ubiquinona (Di Donato, 2000). O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidoredutase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II, succinato desidrogenase, reduz a ubiquinona com elétrons do  $FADH_2$  provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III, citocromo  $bc_1$  ou ubiquinona-citocromo c oxidoredutase, catalisa a redução do citocromo c a partir da ubiquinona reduzida. O complexo IV, conhecido como citocromo oxidase, catalisa a transferência dos elétrons do citocromo c para o  $O_2$ , reduzindo-o a  $H_2O$ . Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (ABELES, FREY e JENCKS, 1992).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Com isso, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o fluxo de prótons volta a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que funciona como uma bomba de prótons ATP dependente trabalhando no sentido reverso, para direcionar a formação de ATP a partir de ADP e Pi (NELSON e COX, 2000b).

Além do possível déficit na produção de ATP, algumas doenças genéticas e outros distúrbios que envolvam a cadeia respiratória aumentam os níveis de NADH, inibindo o ciclo do ácido cítrico e impedindo a entrada de piruvato no mesmo. Como consequência, o piruvato é convertido em lactato, cujos níveis aumentam no sangue (VOET e VOET, 1990).

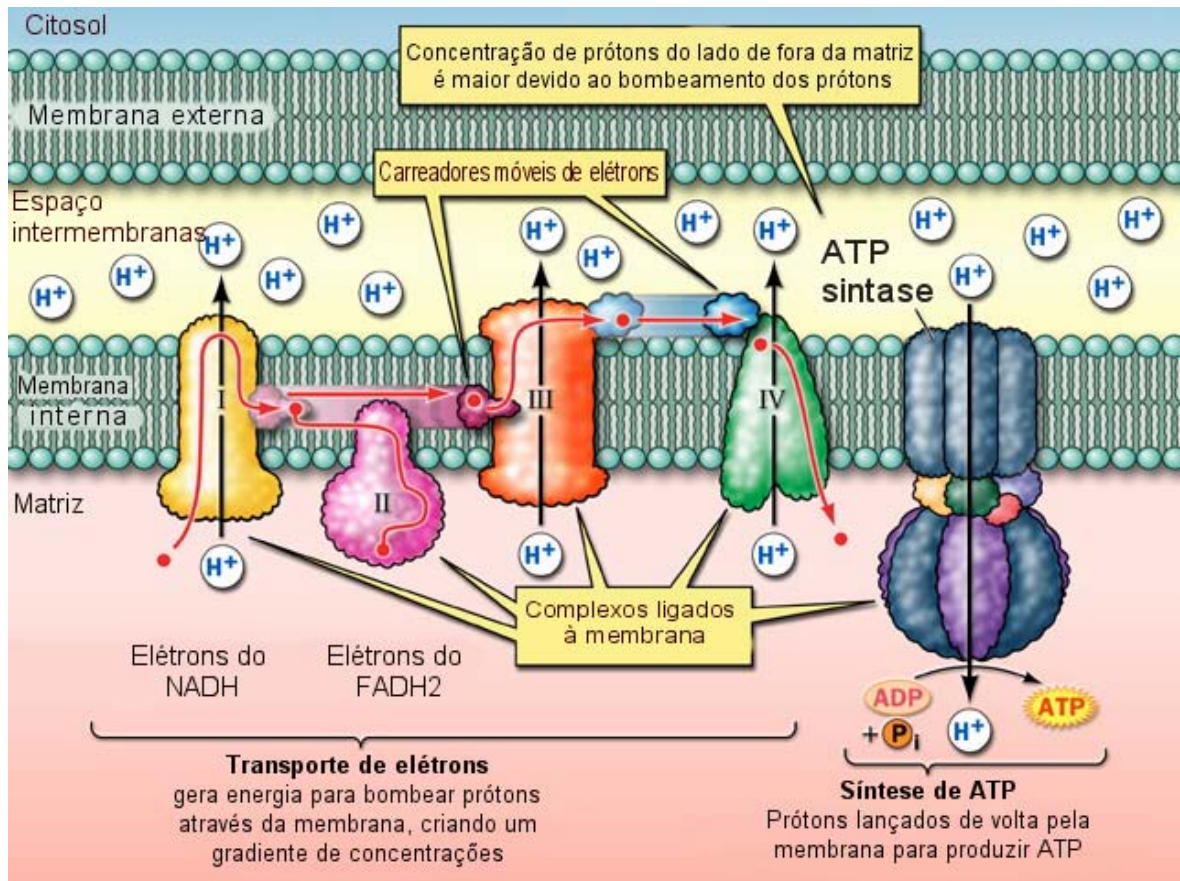
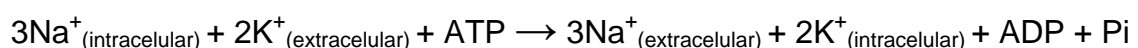


Figura I.5. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória. O gradiente eletroquímico transmembrana formado é utilizado pela ATP-sintase para a síntese de ATP (adaptado de NELSON e COX, 2000).

## I. 5 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

A enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é uma proteína transmembrana constituída por dois tipos de subunidades: a subunidade  $\alpha$  de 110kD, que contém os sítios catalíticos e de ligação de íons, e a subunidade  $\beta$ , que é uma glicoproteína de 55kD de função desconhecida, formando uma estrutura dimérica  $(\alpha\beta)_2$ . A função dessa enzima é translocar os cátions Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana plasmática contra seus gradientes de concentração, utilizando a energia fornecida pela hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP). A enzima transporta simultaneamente 3 Na<sup>+</sup> para fora e 2 K<sup>+</sup> para dentro da célula. A saída de Na<sup>+</sup> capacita as células animais a controlar osmoticamente seu conteúdo hídrico. Como três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular e somente duas para o meio intracelular, o fluxo de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> 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 de substâncias dependente de íon Na<sup>+</sup>, de aminoácidos, de neurotransmissores e para cotransporte/antiporte de outros íons (GEERING, 1990). Todas as células eucarióticas superiores consomem o ATP por elas produzido para a manutenção das concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, sendo que esse consumo pode ser da ordem de 40 a 60% nas células neuronais (WHITTAN, 1962).

A reação catalisada pela Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é a seguinte:



Alterações nos mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a taxa de sódio e potássio intra e extraneuronal podem causar graves conseqüências nas células do SNC (ERECINSKA e SILVER, 1994), tendo sido associadas com despolarização

excessiva, instabilidade da membrana e descargas paroxísticas (DONALDSON et al., 1977).

Glicosídeos cardiotônicos, tais como a digoxina e a ouabaína, inibem a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -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 hidroxila (HITSCHKE et al., 1994) e também quando exposta a sistemas artificiais produtores de radicais livres em homogenizado de cérebro de ratos (TSAKIRIS et al., 2000).

Diversas investigações têm examinado o funcionamento da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em tecido normal e tecido obtido de foco epiléptico na tentativa de identificar anormalidades na função da enzima que possam estar correlacionadas com tal patologia. Hanglund et al. (1985) mostraram que uma menor atividade da enzima em regiões cerebrais parece estar relacionada a anormalidades encontradas em crises convulsivas, talvez refletindo uma menor atividade na regulação do potássio extracelular. Rapport et al. (1975) encontraram uma diminuição de 60% na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral obtido de paciente que apresentava convulsões generalizadas intratáveis. Além disso, a inibição da enzima está associada à liberação de neurotransmissores em uma variedade de preparações neuronais (JACOBSON et al., 1986).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que alguns aminoácidos inibem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A fenilalanina e seus metabólitos desaminados (fenilpiruvato,

fenilacetato e fenilactato) inibem *in vitro* a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em torno de 20% (WYSE et al., 1995). Bürger (1998) demonstrou semelhante inibição para leucina, valina, isoleucina e seus cetoácidos, compostos acumulados na doença do xarope do bordo.

Através de estudos dos efeitos *in vivo* da administração de fenilalanina sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de córtex cerebral de ratos, Wyse et al. (1995) demonstraram que na hiperfenilalaninemia experimental produzida pela administração crônica de fenilalanina ocorre uma diminuição significativa na atividade específica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Posteriormente, Wyse et al. (1998) mostraram que tanto a administração crônica de ácido propiônico, como a presença desse ácido no meio de incubação, inibem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral de ratos.

## **I. 6 Creatina quinase**

A enzima creatina quinase (CK) (E.C. 2. 7. 3. 2) catalisa a reação reversível de transferência do grupamento  $\gamma$ -fosfato do ATP para o grupamento guanidino da creatina (Cr), formando fosfocreatina (PCr) e ADP (figura I.6). A CK está presente em grandes quantidades em tecidos que requerem altas e variáveis demandas de energia, como o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).



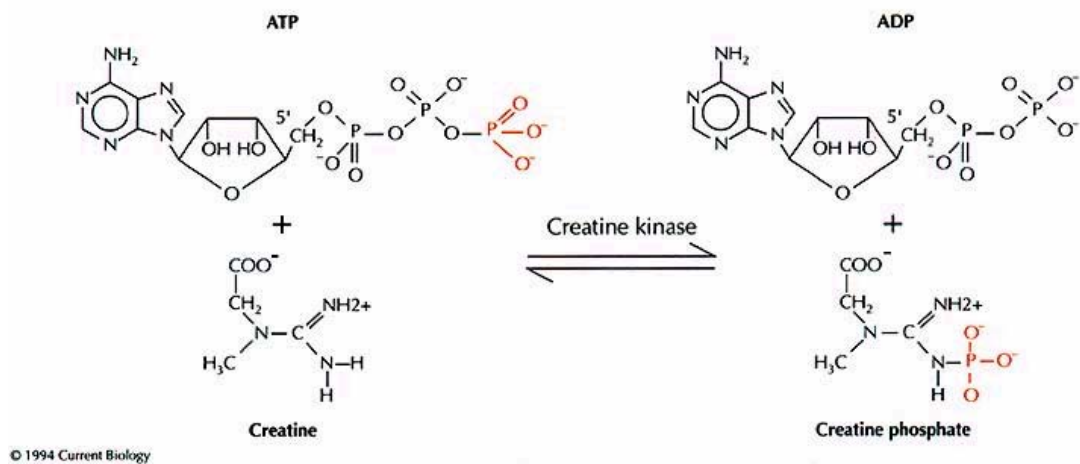


Figura I.6. Reação catalisada pela creatina quinase (CK).

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 exclusivamente como moléculas diméricas, compostas por dois tipos de subunidades (CKB e CKM), originando três diferentes isoformas: CK-MM (predominante em músculo esquelético adulto), CK-BB (predominante em cérebro) e CK-MB (predominante em músculo cardíaco) (MANOS; BRYAN e EDMOND, 1991; MOLLOY et al., 1992). As duas isoenzimas mitocondriais, mi-CK onipresente 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 matrix mitocondrial para o espaço intermembranas. O grupamento  $\gamma$ -fosfato do ATP é transferido pela mi-CK no espaço intermembranas

para a Cr, formando ADP e PCr. A PCr deixa a 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 pode retornar à mitocôndria fechando o ciclo (figura 1.7) (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Kaldis et al. (1996) verificaram que, em regiões cerebrais ricas em mitocôndrias, grandes quantidades de mi-CK foram encontradas juntamente com CKBB, o que poderia reforçar a hipótese desta associação.

Tem sido demonstrada também uma relação da CK com ATPases celulares específicas, como as bombas responsáveis por manter gradientes iônicos celulares (MOLLOY et al., 1992; KALDIS et al., 1996).

São relatadas, basicamente, duas funções para o sistema Cr/CK/PCr: a função de tamponamento energético e a função de transporte de grupamentos “fosfato de alta energia”. Enquanto para o tamponamento energético uma alta atividade da mi-CK não seria requerida, para a função de transporte sua atividade pode ser essencial, principalmente quando a difusão de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial externa for limitada. De acordo com esta idéia, a atividade da mi-CK está relacionada à capacidade oxidativa da musculatura estriada, sendo muito maior no tecido cardíaco (cerca de 35% da atividade total da CK) que em músculo esquelético (0,5-2% da atividade da CK total) (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que a mi-CK é susceptível à inativação por peroxinitrito, produto que se acumula em diversas doenças neurodegenerativas. Esta inibição está relacionada à alteração de seus grupos tióis mediante a ação de agentes oxidantes (STACHOWIAK et al., 1998). Além disso, a diminuição de atividade da CKBB tem sido encontrada em pacientes com certas doenças, como o

mal de Alzheimer, em que o dano oxidativo parece estar relacionado à neurodegeneração (AKSENOV et al., 2000).

Inibição *in vitro* da atividade total da CK, bem como de suas isoenzimas citosólica e mitocondrial, causada por ácidos orgânicos acumulados em algumas acidemias orgânicas, clinicamente caracterizadas por severa encefalopatia, têm relacionado um possível prejuízo na produção ou no consumo de energia com a fisiopatogenia destas doenças (da SILVA et al., 2004).

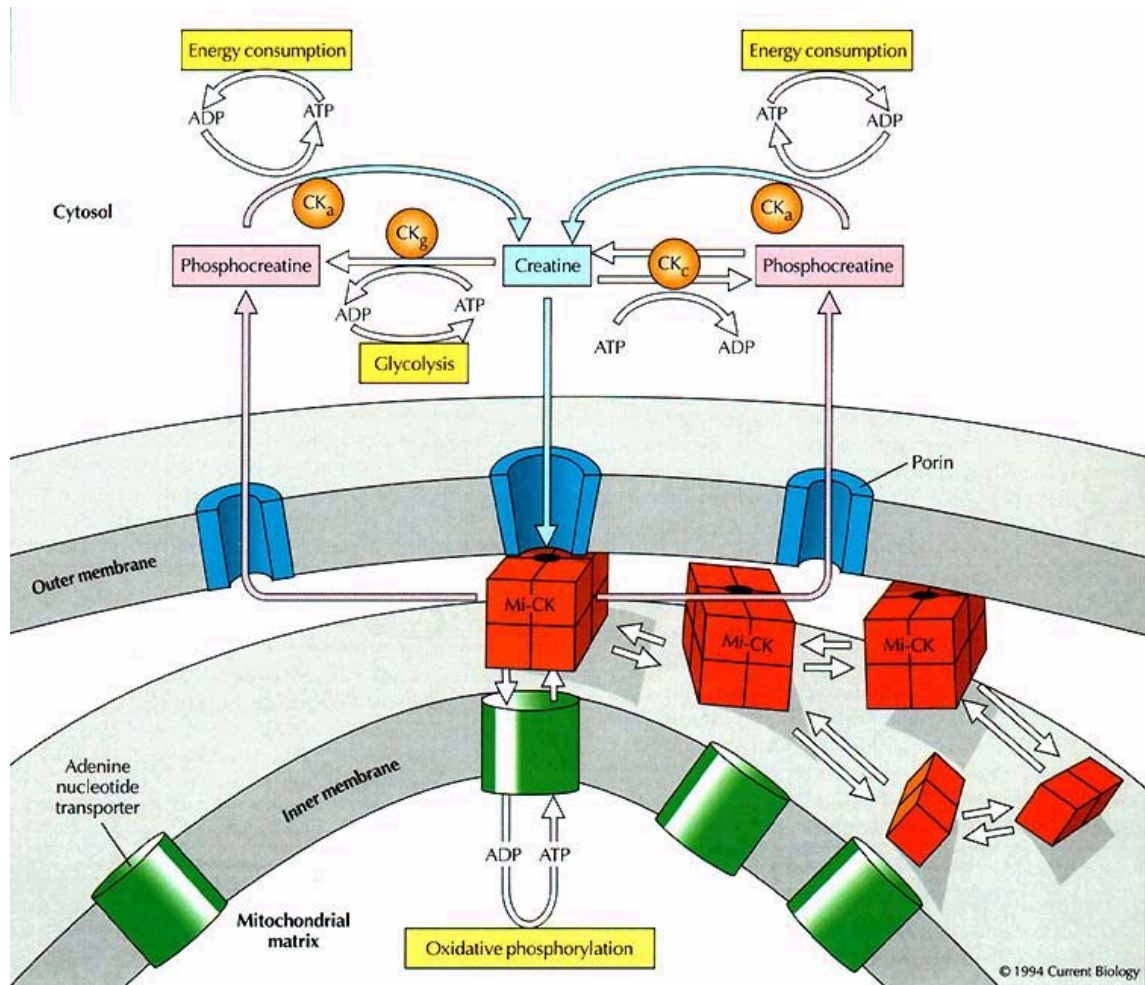


Figura I.7. Função do sistema Cr/CK/PCr na difusão dos grupamentos “fosfato de alta energia” e no tamponamento dos níveis de ATP junto aos sítios de consumo.

## II OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo estudar os efeitos *in vitro* dos ácidos 2-metilacetoacético (MAA) e 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB), que se acumulam nas deficiências da  $\beta$ -cetotilase e da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD), sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens, tendo em vista que os pacientes afetados por estas desordens apresentam sintomatologia neurológica predominante e altos níveis teciduais de ácidos graxos.

### II. 1 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do MAA e do MHB sobre a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de D-[U- $^{14}\text{C}$ ] glicose, [1- $^{14}\text{C}$ ] ácido acético e [1,5- $^{14}\text{C}$ ] ácido cítrico em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
- Estudar o efeito do MAA e do MHB sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
- Estudar o efeito do MAA e do MHB sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de membranas sinápticas isoladas de córtex cerebral de ratos jovens.
- Estudar o efeito do MAA e do MHB sobre as atividades total, citosólica e mitocondrial da creatina quinase, bem como a influência de antioxidantes sobre as alterações destas atividades na presença destes ácidos em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

## III MATERIAL E MÉTODOS

### III. 1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA).

Os ácidos 2-metilacetoacético (MAA) e 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão específica de cada técnica no dia da realização dos ensaios.

#### III. 1. 1 Reagentes utilizados

- $\alpha$ -Naftol - Sigma
- [1,5-<sup>14</sup>C] ácido cítrico - Amersham
- [1-<sup>14</sup>C] ácido acético - Amersham
- Ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico
- Ácido 2-metilacetoacético
- Ácido acético - Merck
- Ácido cítrico - Merck
- Ácido clorídrico - Merck
- Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) sal dissódico - Sigma
- Ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-etano sulfônico (HEPES) - Sigma
- Ácido orto-fosfórico - Merck
- Ácido p-hidroxi-mercuribenzóico (pHMB) - Sigma
- Ácido tricloroacético - Merck
- Adenina-5'-difosfato (ADP) - Sigma
- Adenosina-5'-trifosfato (ATP) - Sigma

- Albumina bovina - Sigma
- Álcool polivinílico - Vetec
- Azida sódica - Sigma
- Bicarbonato de potássio - Reagen
- Borohidrato de sódio - Sigma
- Cianeto de potássio - Merck
- Citocromo c - Sigma
- Cloreto de magnésio hexahidratado - Sigma
- Cloreto de potássio - Merck
- Cloreto de sódio -Sigma
- Coomassie Brilhante Blue G - Sigma
- Creatina - Sigma
- D-[U-<sup>14</sup>C] glicose - Amersham
- Diacetil - ICN
- Dicloroindofenol (DCIP) - Sigma
- Fosfato de potássio dibásico - Reagen
- Fosfato de potássio monobásico - Merck
- Fosfocreatina - Sigma
- Glicose - Sigma
- Glutaciona - Sigma
- Heparina 5000 U.I./mL - Cristália
- Hiamina - Sigma
- Hidróxido de sódio - Vetec
- Lauril-maltosídeo - Sigma
- Líquido de cintilação Opti Phase "Hi Safe" 3 - Wallac

- Metassulfato de fenazina (PMS) - Sigma
- Molibdato de amônio - Vetec
- N<sup>o</sup>-nitro-L-argininametiléster (L-NAME) - Sigma
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ( $\beta$ -NADH) - Sigma
- Ouabaína - ICN
- POP e POPOP - Sigma
- Rotenona - Sigma
- Sacarose - Reagen
- Succinato de sódio hexahidratado - Sigma
- Sulfato de magnésio heptahidratado - Reagen
- Tolueno - Merck
- Trisma base - Sigma
- Verde malaquita - Sigma

### **III. 2 Equipamentos e outros materiais**

- Agitador de tubos Thermolyne modelo Maxi Mix Plus
- Agitador magnético Fisaton modelo 1005
- Balança Acculab modelo V-200
- Balança analítica digital Sartorius Basic
- Balança digital Kern modelo 430-21
- Banho metabólico Dubnoff
- Banho-maria Biomatic modelo 1052
- Centrífuga Du Pont modelo Sorvall RC 5B Plus
- Centrífuga Eppendorf modelo 5403
- Contador de cintilação líquida Wallac modelo 1409



- Deionizador
- Destilador
- Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 com leitura cinética e controle de temperatura
- Freezer -20°C Prosdóscimo modelo H5
- Freezer -70°C Scien Temp
- Guilhotina
- Homogenizador elétrico B. Braun Biotech International modelo Potter S
- Máquina de fazer gelo Everest
- Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas
- Micropipetas de volume regulável Gilson
- Microultracentrífuga Hitachi modelo Himac CS 120 GX
- Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal).
- Refrigerador Brastemp.
- Tubos plásticos Eppendor
- Ultracentrífuga Hitachi modelo Himac CP 70 MX
- Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, balões volumétricos, pacas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensaio, béqueres, cubetas, vials, poços

### **III. 3 Animais**

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  $\pm 12$  horas a uma temperatura de

24±1°C. Os animais tinham livre acesso à água e ao alimento (ração Supra ou Purina, São Leopoldo, RS).

### **III. 4 Produção de CO<sub>2</sub> por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

A produção de CO<sub>2</sub> por homogeneizados de córtex cerebral foi determinada a partir de três diferentes substratos no meio de incubação que continha:

- D-[U-<sup>14</sup>C] glicose (0,055 µCi), na presença de 5 mM de D-glicose
- [1-<sup>14</sup>C] ácido acético (0,055 µCi), na presença de 1 mM de ácido acético
- [1,5-<sup>14</sup>C] ácido cítrico (0,23 µCi), na presença de 1 mM de ácido cítrico

Os tubos testes continham 0,01, 0,1 e 1 mM de MAA ou MHB. Os tubos controles não continham nenhum dos ácidos.

#### **III. 4. 1 Preparação do tecido**

Os animais foram sacrificados por decapitação, o córtex cerebral foi isolado e homogeneizado na proporção de 1:10 em solução tampão contendo KHCO<sub>3</sub> 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM, NaCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, EDTA 0,2 mM e sacarose 24 mM, pH 7,4, previamente aerada com mistura carbogênica durante 10 minutos (solução tampão desenvolvida pelo Professor Dr. Marcos L. S. Perry baseada nas concentrações iônicas intracelulares).

#### **III. 4. 2 Captação de CO<sub>2</sub>**

Um volume de 450 µL de homogeneizado, contendo aproximadamente 45 mg de córtex cerebral, foi pré-incubado na presença de 1,4 mM de lauril-maltosídeo durante 20 minutos a 35°C em banho metabólico com agitação. Após, foram acrescentados ao meio de incubação os substratos marcados e os ácidos a serem

testados (tubos testes). Os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo poços de vidro com papel filtro dobrado em forma de “W”, vedados com parafilme e devolvidos ao banho. Transcorrida 1 hora de incubação a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de TCA 50% ao homogeneizado. Foi adicionada então 100  $\mu\text{L}$  de hiamina ou NaOH 2 M dentro dos poços. Os frascos foram novamente vedados com parafilme e mais uma vez devolvidos ao banho por 30 minutos para que o  $\text{CO}_2$  pudesse ser incorporado ao papel filtro impregnado por hiamina ou NaOH. Terminado este procedimento, o papel filtro embebido em hiamina ou NaOH 2M foi retirado com o auxílio de uma pinça e de uma micropipeta sendo transferido para vials de plástico. Em cada vial foi adicionado 3 mL de líquido de cintilação POP/POPOP/tolueno (4g/ 50 mg/ tolueno q.s.p 1000 mL) quando da adição de hiamina nos poços ou 2 mL de líquido de cintilação Opti Phase “Hi Safe” 3 quando da adição de NaOH 2 M. Posteriormente, os vials foram agitados e a radioatividade incorporada ao  $\text{CO}_2$  foi determinada em contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos em pmol de  $\text{CO}_2$  captado/mg de tecido/h de incubação.

### **III. 5 Determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

A atividade dos complexos da cadeia respiratória foi determinada na presença de 1 mM de MAA ou MHB (tubos testes). Os tubos controles não continham nenhum dos ácidos. MAA e MHB foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão específica de cada técnica. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### **III. 5. 1 Preparação do tecido**

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e o córtex cerebral foi isolado e homogenizado 1:20 (P/V) em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, trisma base 10 mM e heparina dissolvidos em água destilada e deionizada q.s.p 50 mL) pH 7,4 (conforme Dra. Paz Briones – Espanha). Os homogenizados foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos e os sobrenadantes separados em alíquotas de 200 a 300 µL e mantidos a -70°C por um período máximo de um mês até o momento das determinações enzimáticas.

No momento das determinações as amostras foram congeladas e descongeladas por duas vezes consecutivas para a determinação da atividade dos complexos II, II-III e I-III.

### **III. 5. 2 Determinação da quantidade de proteína**

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951) usando albumina bovina como padrão.

### **III. 5. 3 Determinação da atividade do complexo I-III (NADH: citocromo c oxirredutase)**

Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8, KCN 2 mM, EDTA 10 µM, citocromo c 50 µM, foram adicionados 10 a 25 µg de proteínas do homogeneizado e 25 µM de NADH iniciando a reação. A redução do citocromo c foi registrada a 550 nm e 25°C na presença e na ausência dos ácidos por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10 µM de rotenona. As absorvâncias continuaram sendo registradas por mais 3 minutos. A diferença entre os dois momentos de leitura correspondeu à atividade da NADH: citocromo c

oxirredutase sensível à rotenona (SCHAPIRA et al., 1990). A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína.

#### **III. 5. 4 Determinação da atividade do complexo II (succinato: DCIP oxirredutase) e succinato desidrogenase (SDH)**

As atividades enzimáticas do complexo II e da SDH foram determinadas de acordo com FISCHER et al. (1985). Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) 62,5 mM pH 7,4, tampão SETH pH 7,4, succinato de sódio 1 mM, diclorofenolindofenol (DCIP) 9  $\mu$ M, foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140  $\mu$ g de proteína. Tubos testes e controles foram incubados durante 20 minutos, protegidos da luz, a 30°C em banho-maria. Após a incubação, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7  $\mu$ M e DCIP 42  $\mu$ M.

A redução do DCIP foi determinada em 600 nm de comprimento de onda e 25°C durante 5 minutos para a medida da atividade global do complexo II. Transcorridos os primeiros 5 minutos, foi adicionado metassulfato de fenazina (PMS) 1mM para a determinação da atividade da SDH, também pela redução do DCIP, por mais 5 minutos. Ambas as atividades foram expressas em nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína.

#### **III. 5. 5 Determinação da atividade do complexo II-III (succinato: citocromo *c* oxirredutase)**

Ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM pH 7,4, succinato de sódio 16 mM foi adicionada amostra contendo 40 a 80  $\mu$ g de proteína. Tubos testes e controles foram incubados por 30 minutos a 30°C. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7  $\mu$ M de rotenona e a reação foi iniciada pela

adição de 250  $\mu\text{M}$  de citocromo *c*. A redução do citocromo *c* foi registrada em 550 nm de comprimento de onda a 25°C durante 5 minutos (FISCHER et al.,1985). A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* reduzido/min/mg de proteína.

### **III. 5. 6 Determinação da atividade do complexo IV (citocromo *c* oxidase)**

A atividade da citocromo *c* oxidase (COX) foi medida pelo método de Rustin et al. (1994). A oxidação do citocromo *c*, previamente reduzido com borohidrato de sódio, foi registrada a 25°C em 550 nm de comprimento de onda durante 10 min, na presença e na ausência dos ácidos. O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7, lauril-maltosídeo 0,6 mM e amostra com 2 a 4  $\mu\text{g}$  de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 55 mM de citocromo *c* reduzido. A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína.

### **III. 6 Determinação da atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens**

A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi determinada na presença de 1 mM de MAA ou MHB (tubos testes). Os tubos controles não continham nenhum dos ácidos. MAA e MHB foram dissolvidos na solução tampão específica da técnica. Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **III. 6. 1 Preparação de membranas plasmáticas sinápticas**

As membranas foram preparadas de acordo com o método de Jones e Matus (1974). O animal foi decapitado, o córtex cerebral foi isolado e homogeneizado em 10 volumes de uma solução contendo 0,32 mM de sacarose, 5,0 mM de HEPES e 0,1 mM de EDTA. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos a

4°C. A solução sobrenadante foi separada e novamente centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi suspenso em uma solução hipotônica de Tris-HCl 5 mM pH 8,1 sendo mantido em gelo durante 30 minutos para que ocorresse a lise dos sinaptossomas. Sobre este lisado foi montado um gradiente descontínuo de sacarose constituído de três camadas de diferentes concentrações (48, 28,5 e 10%). Este gradiente, contendo a amostra misturada à fração mais densa de sacarose (48%), foi centrifugado a 69.000 x g por 2 horas a 4°C. Conforme Jones e Matus (1974), após esta centrifugação, a fração de menor concentração (sacarose 10%) é composta basicamente por mielina; a fração intermediária é constituída principalmente por membranas plasmáticas sinápticas (situadas na interface das soluções 28,5 e 48%) e a última fração (sedimento), composta por mitocôndrias. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a fração intermediária foi aspirada e suspensa em tampão Tris-HCl 5 mM pH 8,1, sendo centrifugada a 37.000 x g durante 20 minutos a 4°C, para remoção da sacarose residual. O sedimento, contendo as membranas plasmáticas sinápticas purificadas, foi suspenso no tampão anteriormente citado de modo a obter-se uma concentração final de proteínas entre 0,15 e 0,25 mg/mL. As amostras foram então separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C até o momento da determinação enzimática.

### **III. 6. 2 Determinação da quantidade de proteína**

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

### **III. 6. 3 Determinação da atividade enzimática**

A atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi medida conforme o método de Tsakiris e Deliconstantinus (1984). O meio de reação continha MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 80 mM, KCl 20 mM, Tris-HCl 40 mM pH 7,4 em um volume final de 200 µL. A atividade de outras ATPases foi medida na presença de ouabaína 1 mM (inibidor específico da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase). A atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foi então calculada como sendo resultante da diferença entre a atividade obtida pelas ATPases no meio sem ouabaína da atividade das ATPases do meio contendo ouabaína. As amostras de membranas sinápticas foram adicionadas ao meio em um volume de 10 µL (0,015 - 0,03 µg de proteína) e pré-incubadas na presença ou ausência dos ácidos a 37°C durante 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mM e o término, após 5 minutos de incubação a 37°C, ocorreu pela adição de 200 µL de TCA 10%. O fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a incubação foi medido pelo método de Chan, Delfert e Junger (1986). A atividade enzimática foi expressa em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína.

### **III. 7 Determinação da atividade da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens**

A atividade total da creatina quinase (CK total) foi determinada na presença de 0,01, 0,1 e 1 mM dos ácidos 2-metilacetoacético (MAA) ou 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) (tubos testes). As atividades das frações citosólica (cy-CK) e mitocondrial (mi-CK) da creatina quinase foram determinadas na presença de 0,01, 0,1 e 1 mM de MHB. Os tubos controles não continham nenhum dos ácidos. Experimentos com antioxidantes foram realizados somente para CK total e mi-CK na



presença de 1 mM de MHB. Os ácidos foram sempre dissolvidos e diluídos na solução tampão da técnica e os experimentos realizados em triplicata.

### **III. 7. 1 Preparação das amostras**

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi removido sobre placa de Petri em gelo, e o córtex cerebral foi rapidamente isolado. Posteriormente, o tecido foi homogeneizado na proporção de 1:10 (P/V) em solução salina, pH 7,5. A homogeneização foi feita manualmente utilizando homogeneizador de vidro em gelo. Parte do homogeneizado foi armazenada em alíquotas de 10  $\mu$ L a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da atividade total da enzima (CK total). Uma segunda parte do homogeneizado foi centrifugada a 800 x g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sedimento resultante dessa centrifugação foi descartado e o sobrenadante foi submetido a uma segunda centrifugação a 27.000 x g por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sedimento resultante, enriquecido em mitocôndrias, foi lavado e centrifugado três vezes com solução salina durante 10 minutos a 800 x g, sendo utilizado na determinação da atividade da fração mitocondrial da enzima (mi-CK). O sobrenadante foi centrifugado por 60 minutos a 125.000 x g em centrífuga a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sedimento foi descartado e o novo sobrenadante foi imediatamente utilizado para a determinação da atividade da fração citosólica (cy-CK).

### **III. 7. 2 Determinação da quantidade de proteína**

O conteúdo protéico foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951) usando albumina bovina como padrão.

### III. 7. 3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da CK foi medida tanto em homogeneizado total de córtex cerebral (CK total) bem como nas frações mitocondrial (mi-CK) e citosólica (cy-CK). A mistura reacional continha tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7.5, fosfocreatina 7 mM, MgSO<sub>4</sub> 9 mM, 0,625 mM de lauril-maltosídeo e aproximadamente 0,4-1,2 µg de proteína em um volume final de 100 µL. Tubos testes e controles foram pré-incubados por um período de 15 minutos a 37°C sendo a reação iniciada com a adição de ADP e glutathiona reduzida a uma concentração final de 3,2 mM e 0,8 mM, respectivamente. A reação foi interrompida após 10 minutos de incubação com a adição de 20 µL de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM. A creatina formada foi estimada através do método colorimétrico de Hughes (1962). A coloração foi obtida pela adição de 100 µL de α-naftol 20%, 680 µL de água deionizada e 100 µL de diacetil 20%. A leitura foi feita após uma segunda incubação de 20 minutos a 37°C por espectrofotometria a 540 nm de comprimento de onda. Para a determinação da atividade da CK total na presença de antioxidantes foram adicionados ao meio de incubação, além de MHB na concentração de 1 mM, glutathiona reduzida (GSH) 0,5 mM ou o inibidor da enzima óxido nítrico sintase N<sup>o</sup>-nitro-L-argininametiléster (L-NAME) 1 mM. Para a determinação da atividade da mi-CK na presença de antioxidantes foi adicionada, além de MHB 1 mM, glutathiona reduzida 0,5 mM. Os efeitos destas substâncias foram comparadas ao efeito do ácido e ao controle. O resultado final foi expresso em µmol de creatina formada/min/mg de proteína.

### **III. 8 Análise estatística**

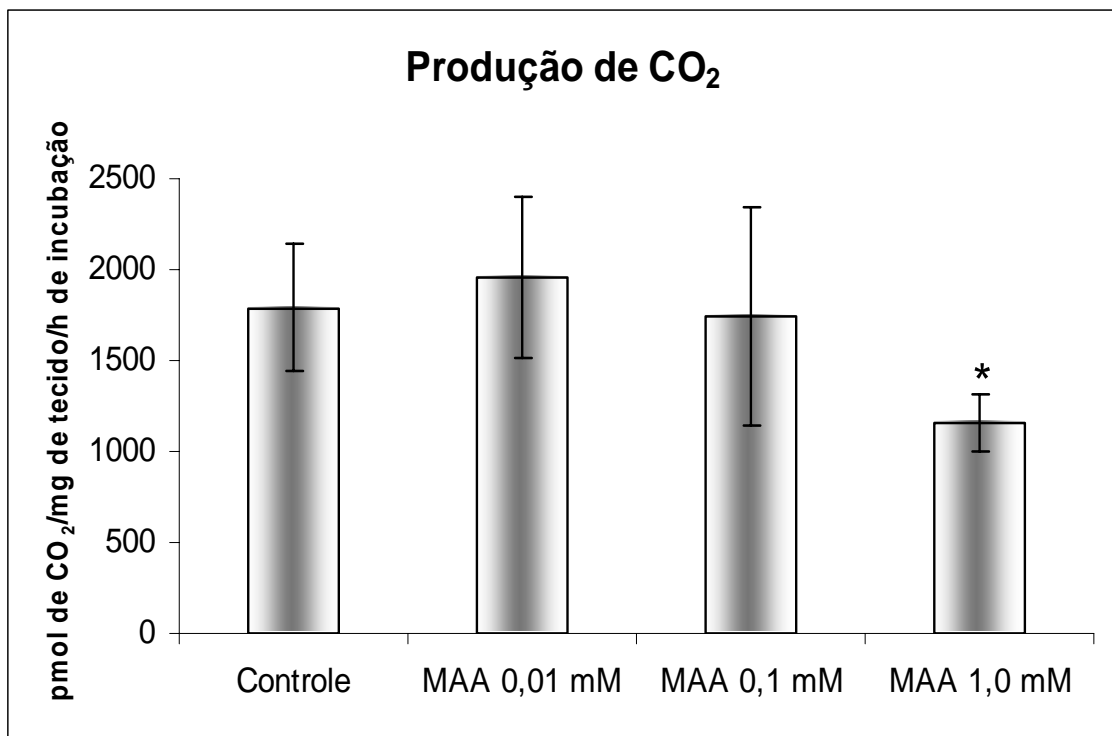
Os resultados foram analisados usando o programa SPSS versão 11.0 em um computador PC compatível. Utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de múltipla amplitude de Duncan, quando o valor de F foi significativo ( $p < 0,05$ ). Os resultados das atividades dos complexos da cadeia respiratória e da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas com significância  $p < 0,05$ . Os efeitos dose-dependentes foram calculados através de regressão linear.

## **IV RESULTADOS**

### **IV. 1 Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.**

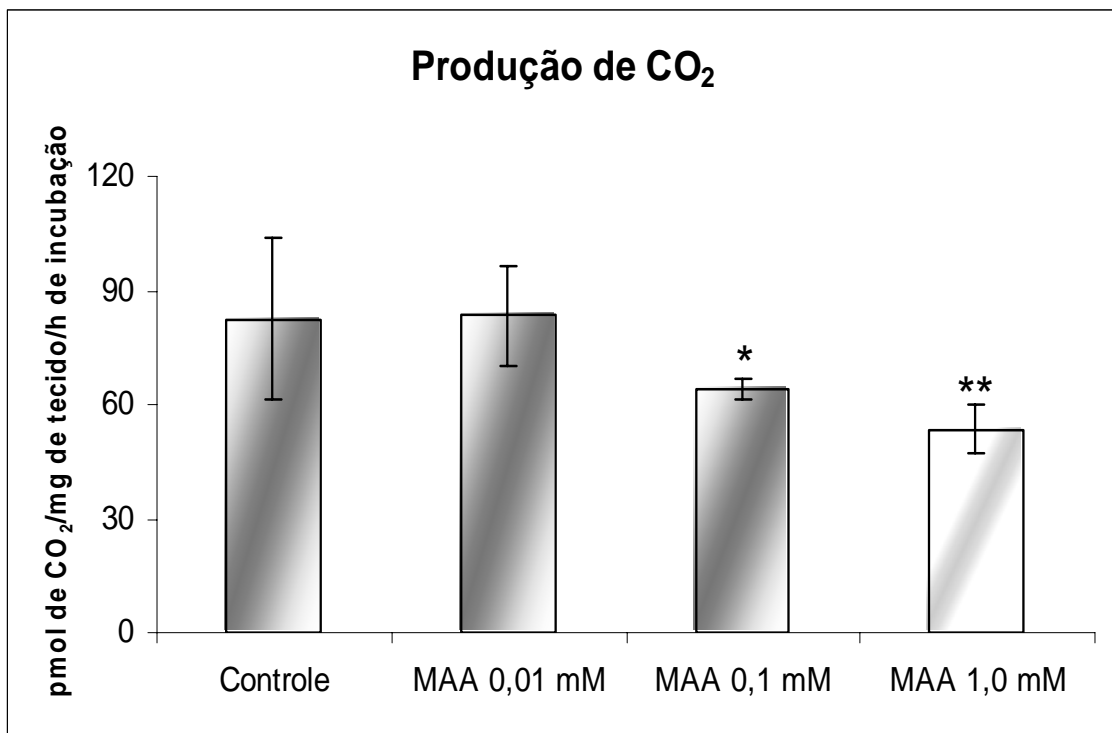
#### **IV. 1. 1 Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.1 mostra que o MAA, na concentração de 1,0 mM, inibe significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose [F(3,19)=4,009; p<0,05]. A figura IV.2 mostra uma inibição significativa da produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato causada pelo MAA nas concentrações de 0,1 e 1,0 mM [F(3,20)=7,632; p<0,01]. Tendo em vista a possibilidade do MAA competir pelo mesmo transportador de membrana mitocondrial (transportador de ácidos monocarboxílicos) com o acetato e com o piruvato (metabólito da glicose), o que impediria a entrada e posterior oxidação dos mesmos a CO<sub>2</sub> na mitocôndria, outros ensaios foram realizados com a utilização de citrato como fonte de carbono, composto que atravessa a membrana mitocondrial pelos transportadores de ácidos di e tricarboxílicos. A figura IV.3 mostra que o MAA, nas três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1,0 mM), inibe significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato [F(3,18)=8,388; p<0,01].



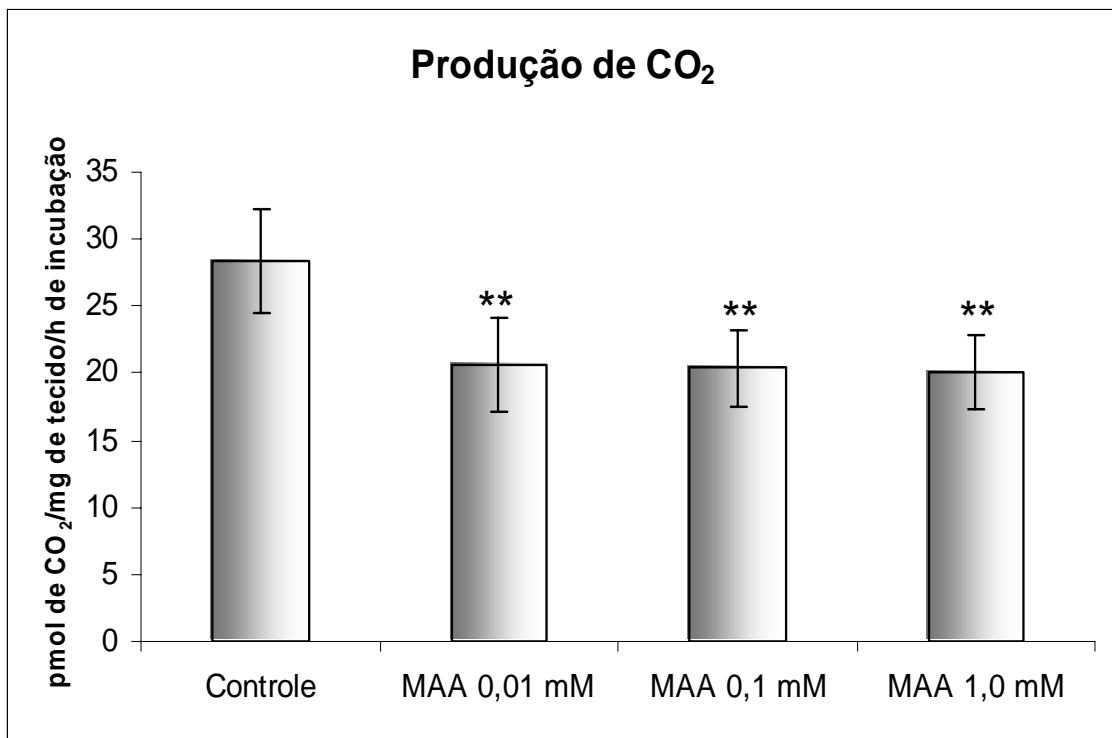
**Figura IV.1. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*p<0,05, comparado ao controle).



**Figura IV.2. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*p<0,05; \*\*p<0,01, comparado ao controle).



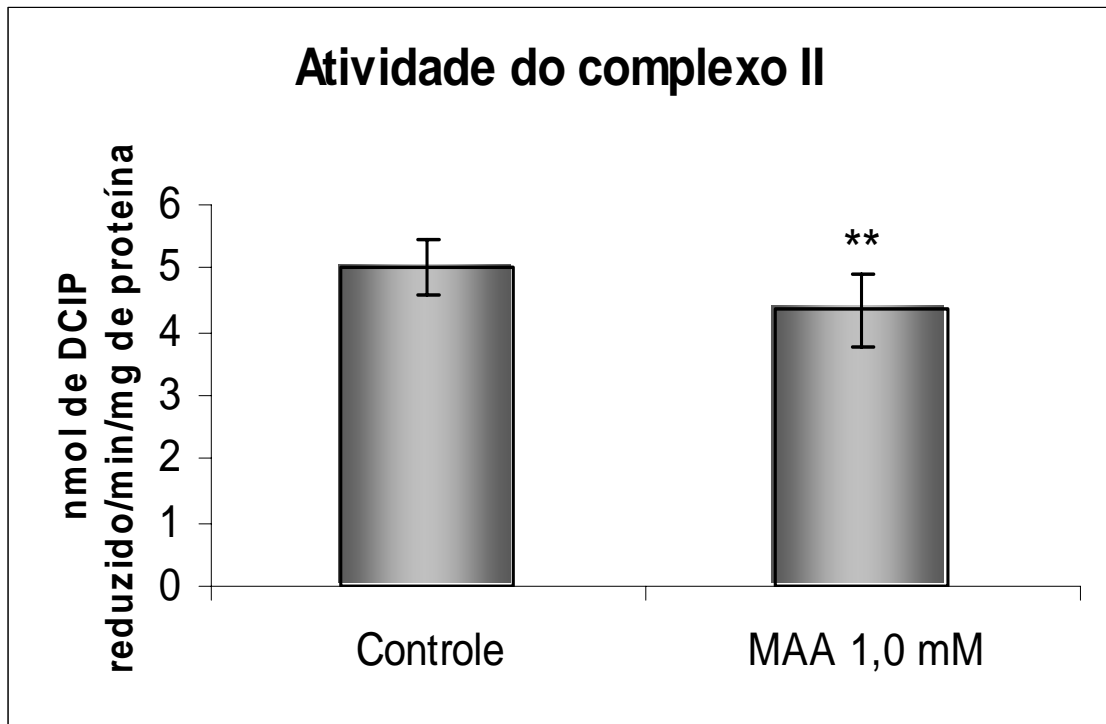
**Figura IV.3. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*\*p<0,01, comparado ao controle).

**IV. 1. 2 Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

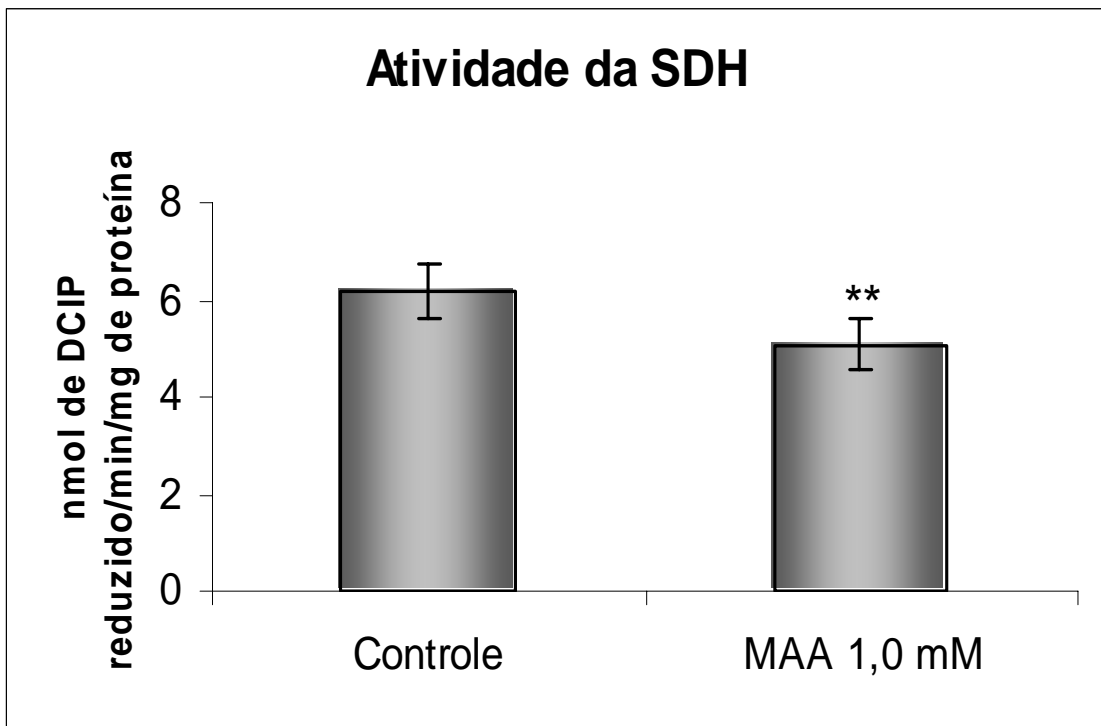
A figura IV.4 mostra que o MAA inibiu significativamente a atividade do complexo II da cadeia respiratória [ $t(6)=5,687$ ;  $p<0,01$ ] bem como a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) [ $t(6)=8,609$ ;  $p<0,01$ ] (figura IV.5). O MAA não teve efeito sobre a atividade dos complexos I-III [ $t(5)=0,768$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.6), II-III [ $t(4)=-1,558$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.7) e IV [ $t(5)=1,693$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.8).





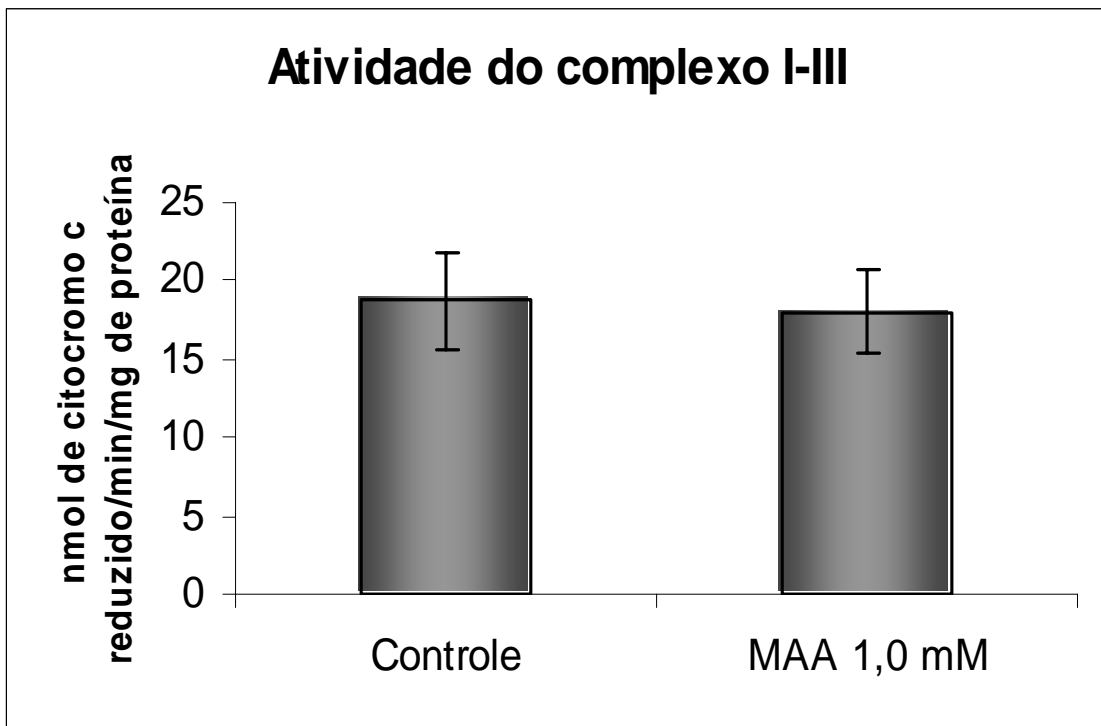
**Figura IV.4. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras pareadas (\*\*p<0,01, comparado ao controle).



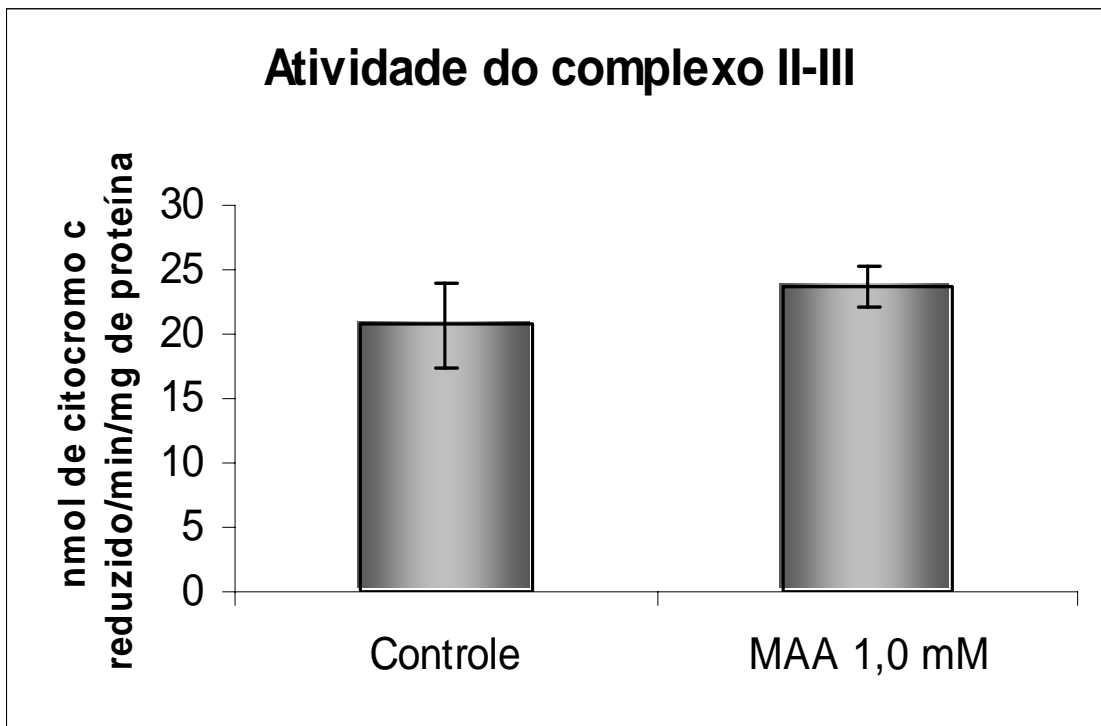
**Figura IV.5. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras pareadas (\*\*p<0,01, comparado ao controle).



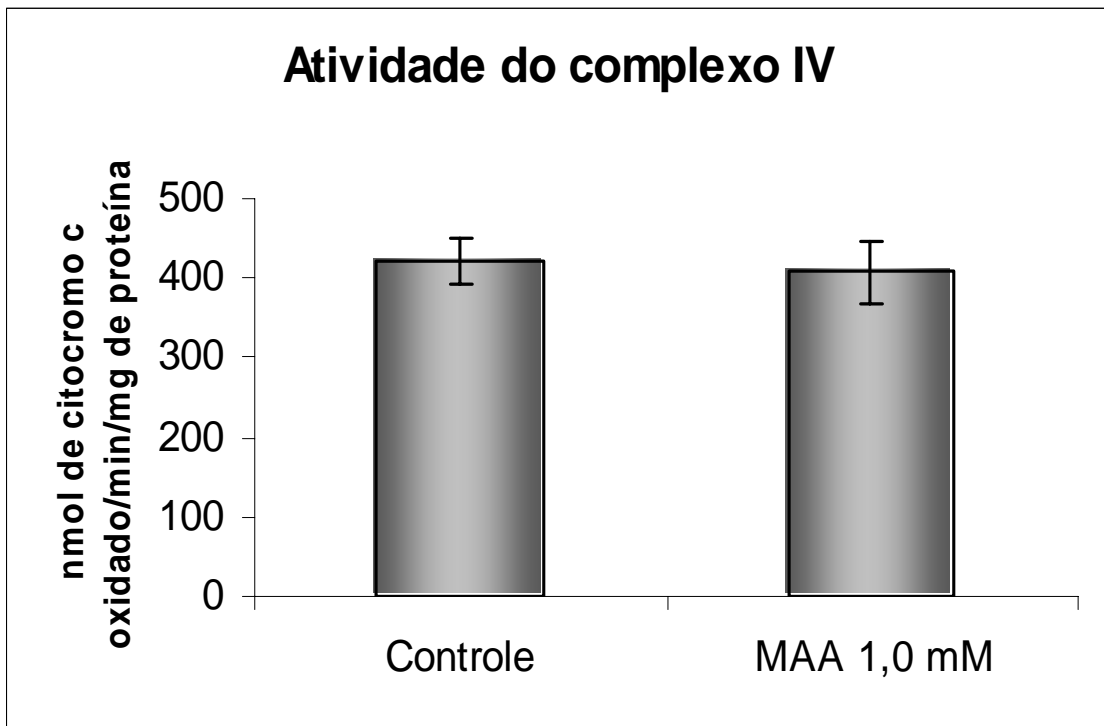
**Figura IV.6. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura IV.7. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

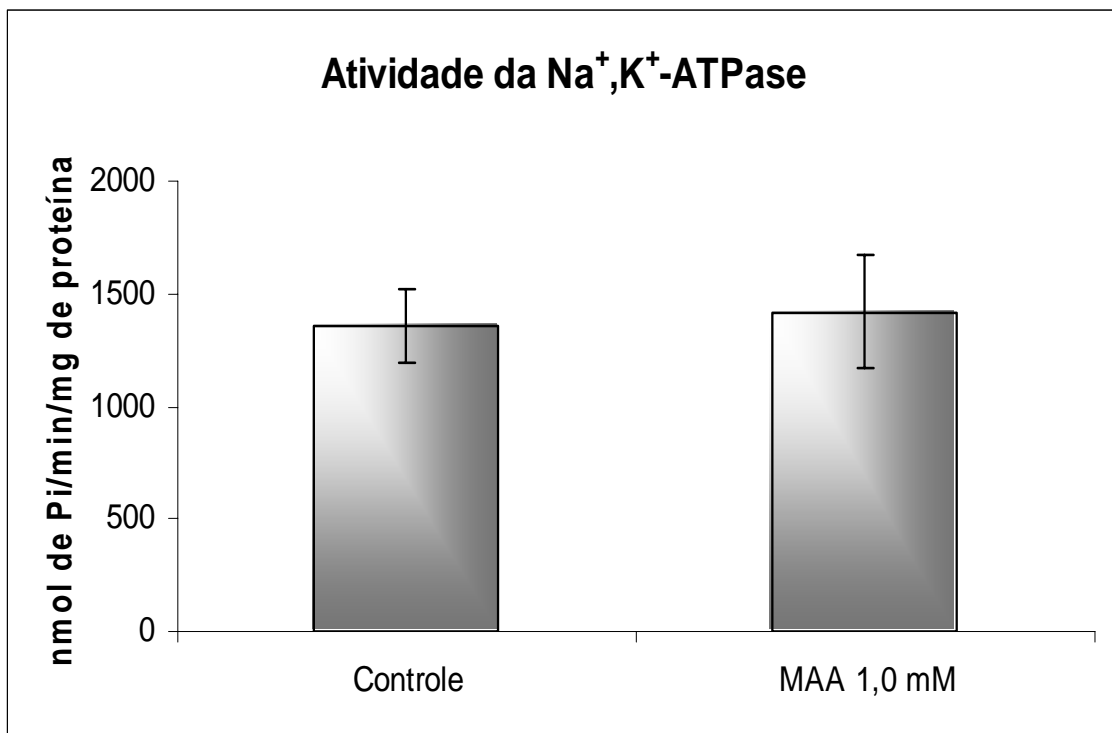


**Figura IV.8. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV. 1. 3 Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.9 mostra que o MAA não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(4)=-0,921; p>0,05].



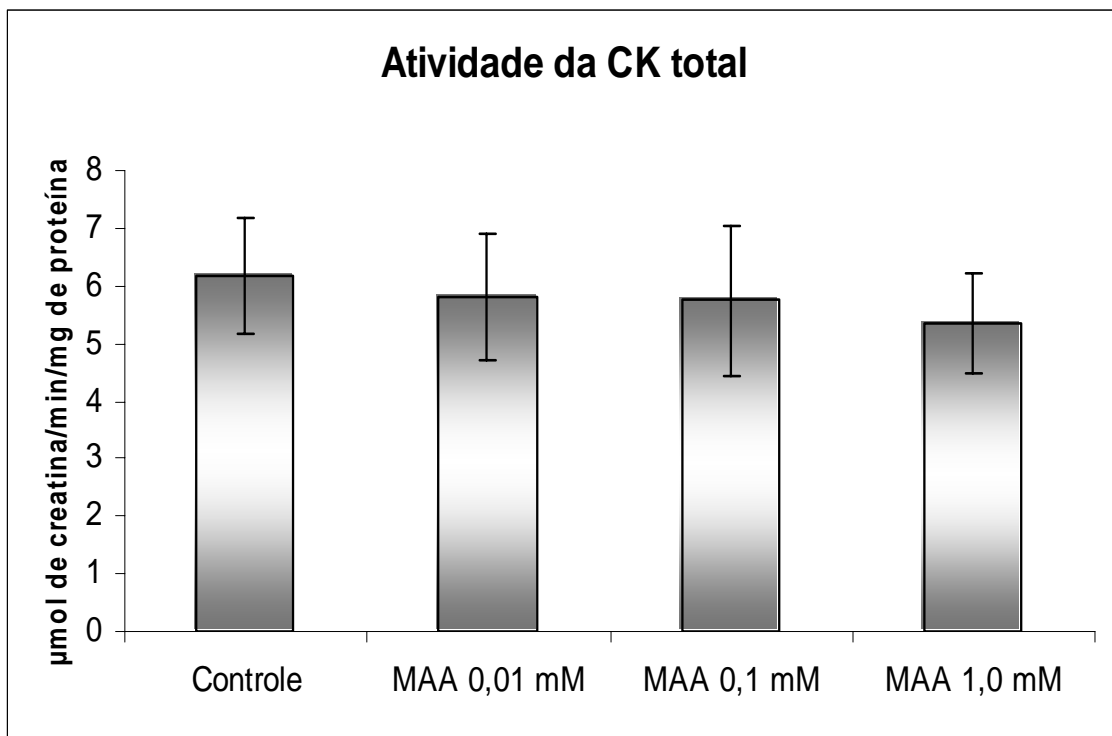
**Figura IV.9. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=5). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV. 1. 4 Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade total da creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.10 mostra que o MAA não exerceu nenhum efeito sobre a atividade total da enzima CK em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens [F(3,20)=0,599; p>0,05].





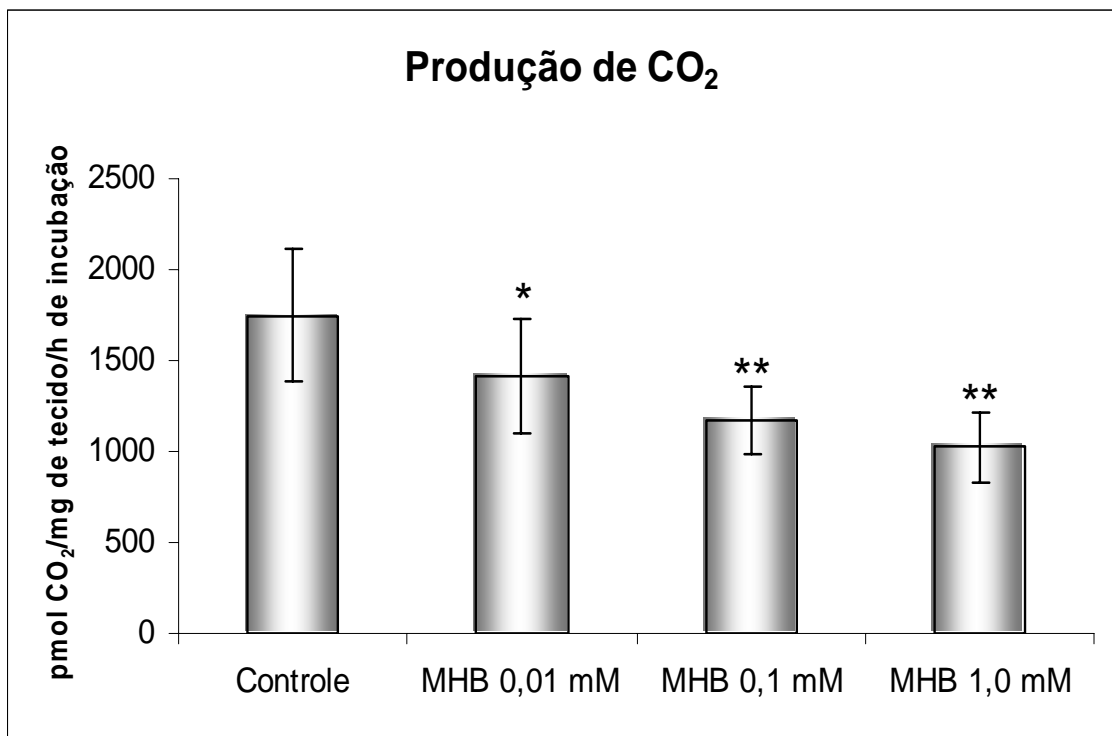
**Figura IV.10. Efeito *in vitro* do ácido 2-metilacetoacético (MAA) sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

## **IV. 2 Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.**

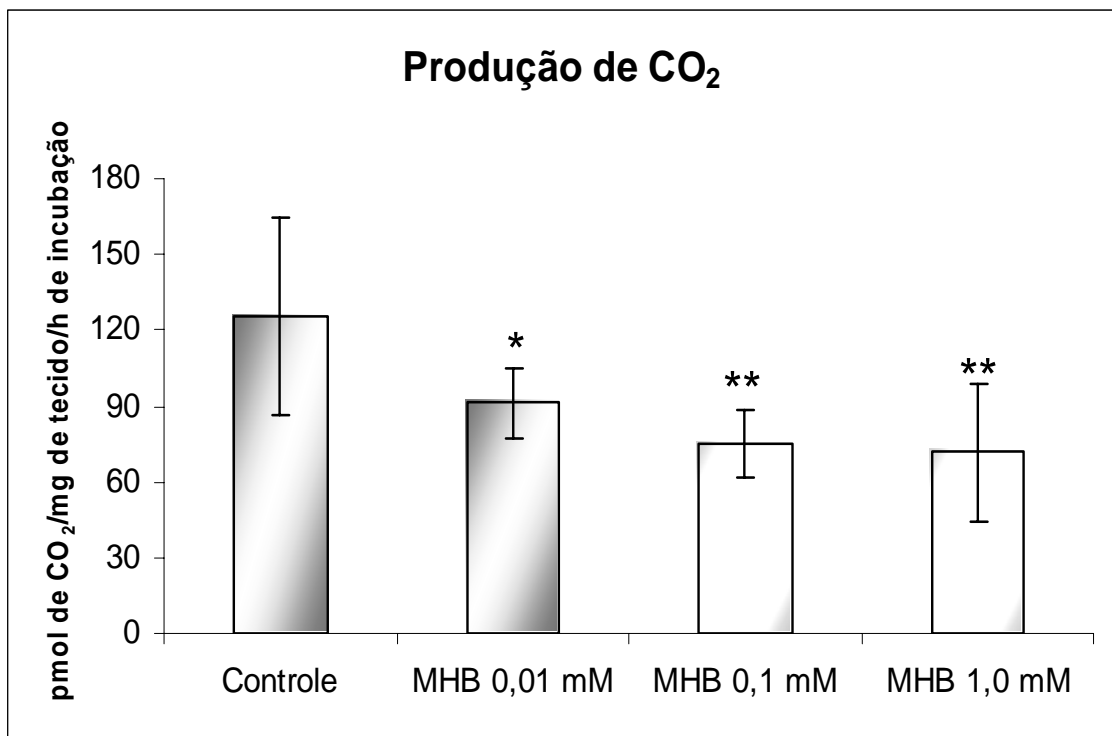
### **IV. 2. 1 Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose, acetato e citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.11 mostra que o MHB, nas três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1 mM), inibe significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose [F(3,20)=8,074; p<0,01] de forma dose-dependente ( $\beta = -0,7299$ ; p<0,001). A figura IV.12 mostra uma inibição significativa da produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato causada pelo MHB nas três concentrações testadas [F(3,20)=5,377; p<0,01]. Como citado anteriormente, existindo a possibilidade do MHB também competir com os compostos anteriores pelo mesmo transportador de membrana mitocondrial, outros ensaios foram realizados com a utilização de citrato como substrato. A figura IV.13 mostra que o MHB, nas três concentrações testadas, inibe significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato [F(3,16)=6,558; p<0,01].



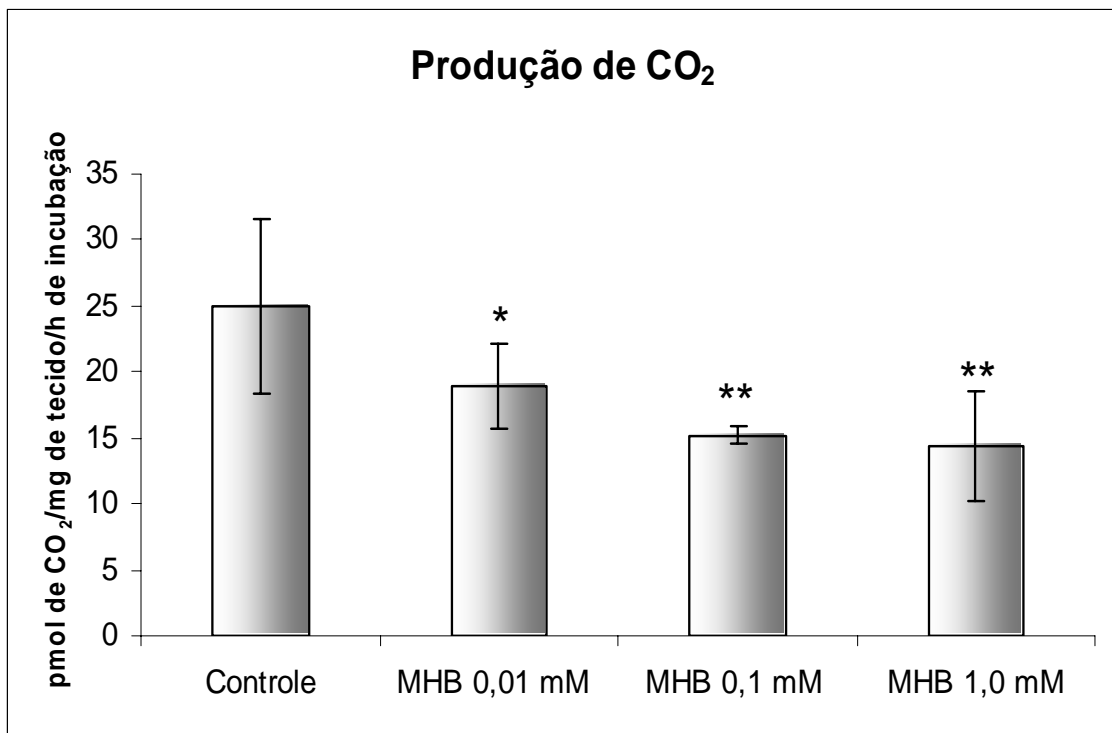
**Figura IV.11. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*p<0,05; \*\*p<0,01, comparado ao controle).



**Figura IV.12. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*p<0,05; \*\*p<0,01, comparado ao controle).

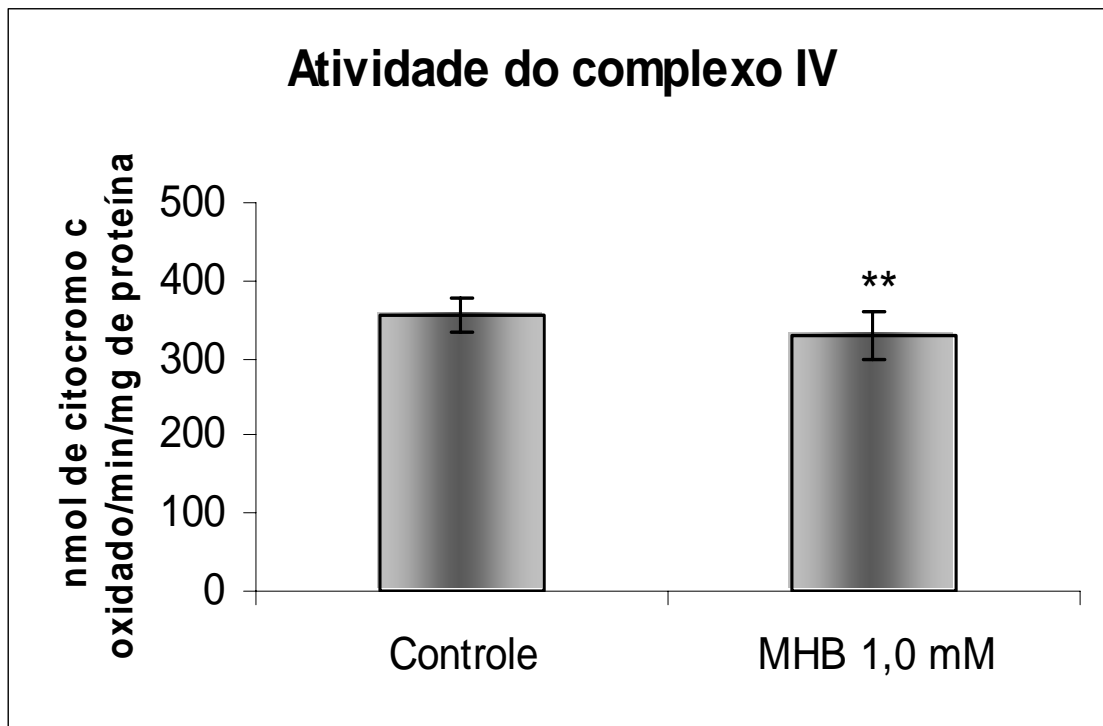


**Figura IV.13. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxibutírico (MHB) sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*p<0,05; \*\*p<0,01, comparado ao controle).

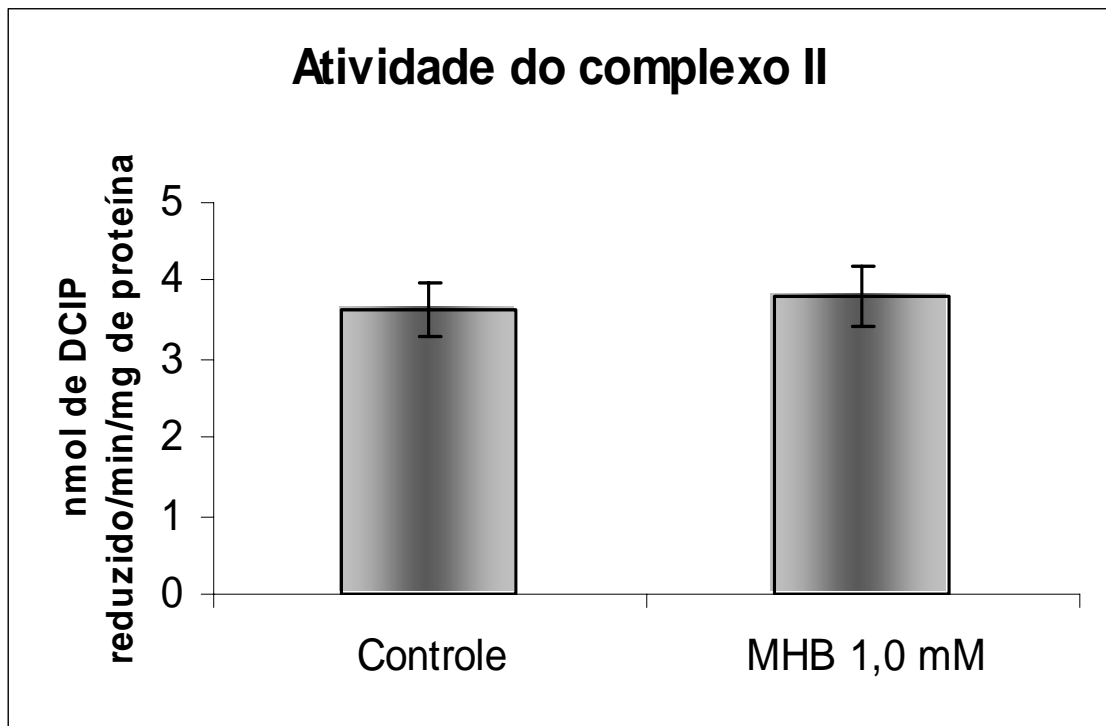
**IV. 2. 2 Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-bútrico (MHB) sobre a atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.14 mostra que o MHB inibiu significativamente a atividade do complexo IV da cadeia respiratória [ $t(5)=4,750$ ;  $p<0,01$ ]. Por outro lado, o MHB não teve efeito sobre a atividade dos complexos II [ $t(6)=-0,842$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.15), I-III [ $t(5)=-2,192$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.16), II-III [ $t(5)=0,487$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.17) e sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [ $t(6)=0,880$ ;  $p>0,05$ ] (figura IV.18).



**Figura IV.14. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

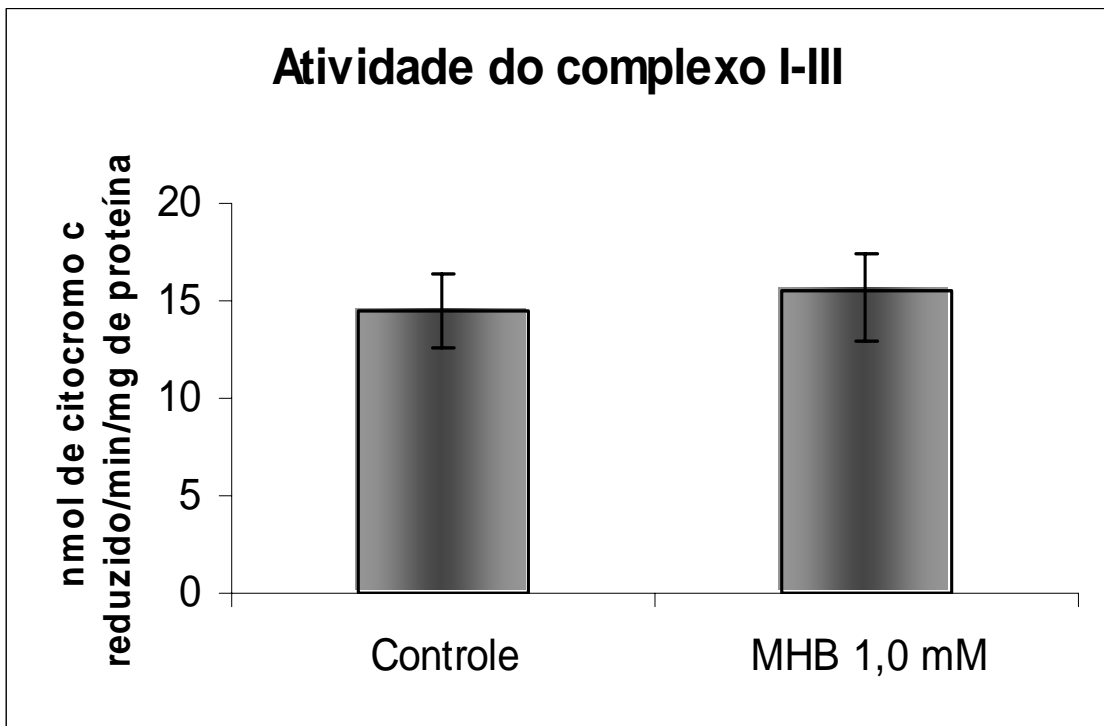
Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras pareadas (\*\*p<0,01, comparado ao controle).



**Figura IV.15. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

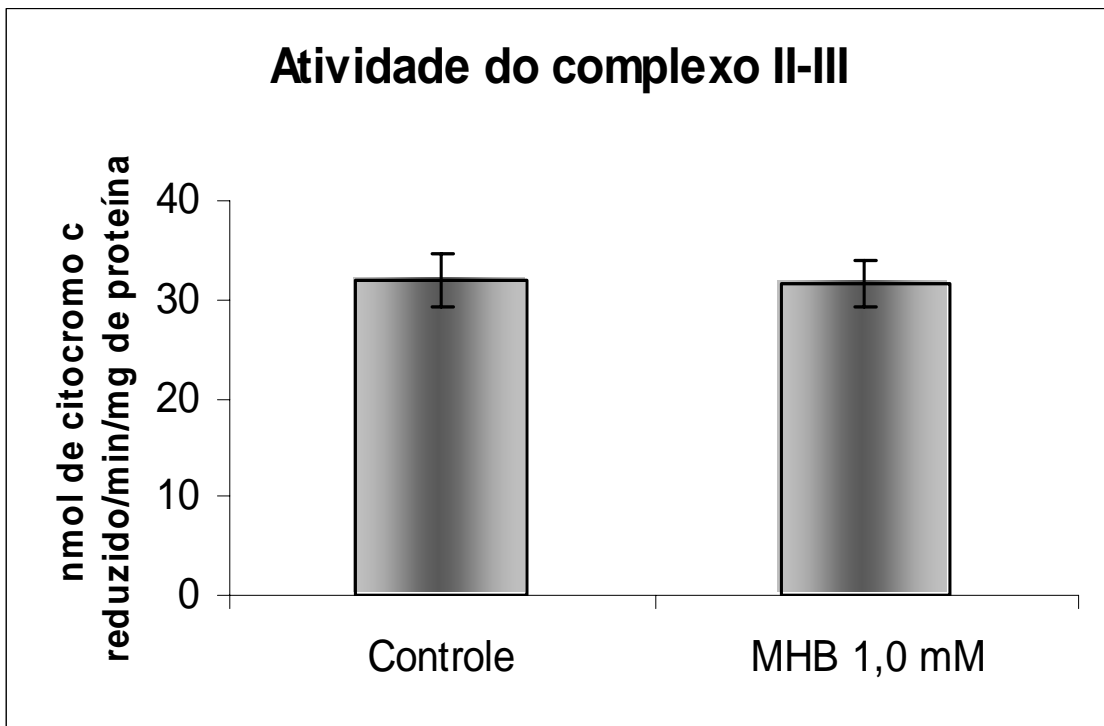
Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=7$ ). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.





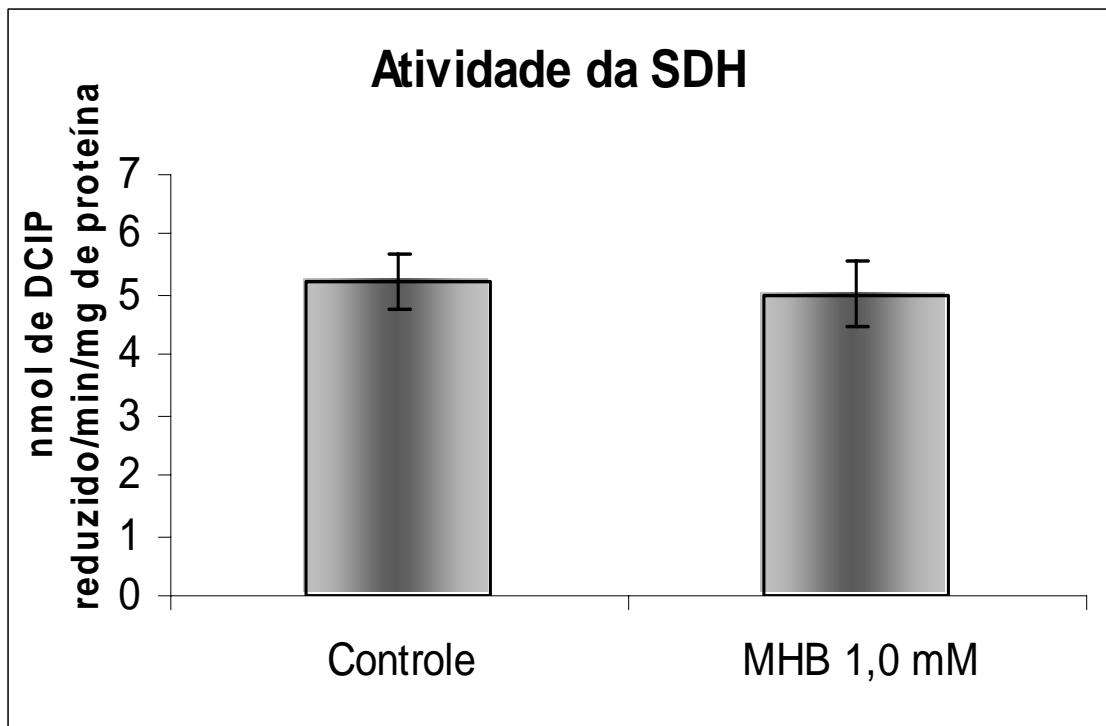
**Figura IV.16. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura IV.17. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$ ). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

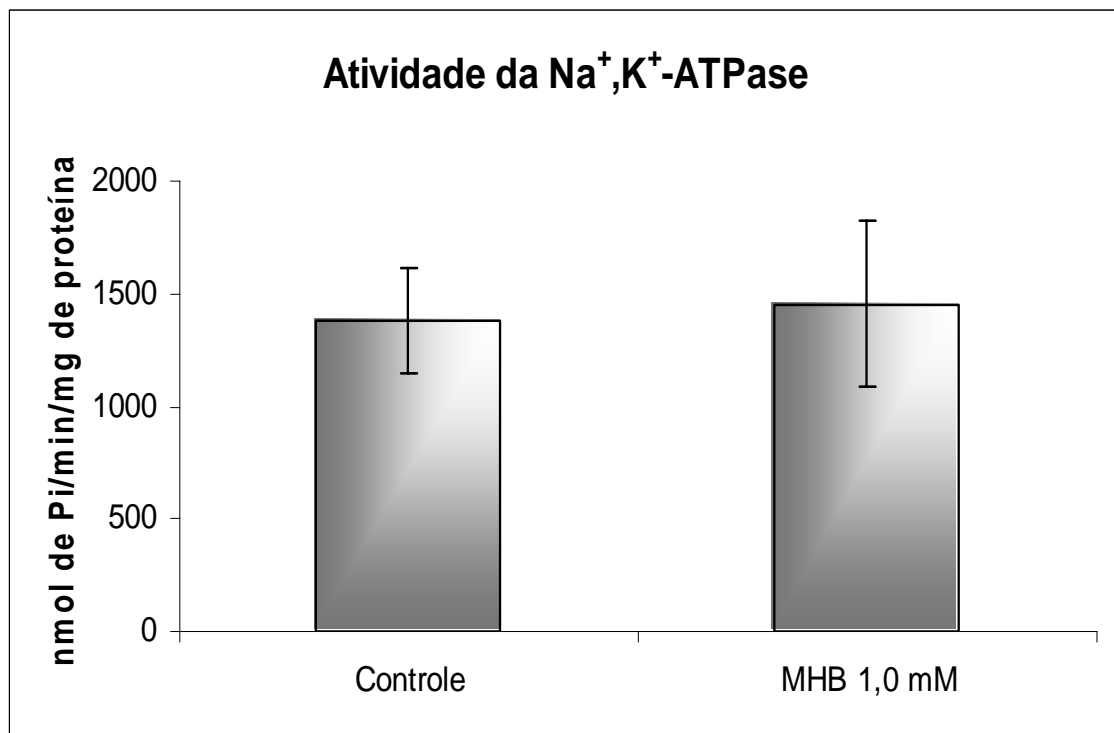


**Figura IV.18. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=7). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**IV. 2. 3 Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.19 mostra que o MHB não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens [t(4)=-0,829; p>0,05].

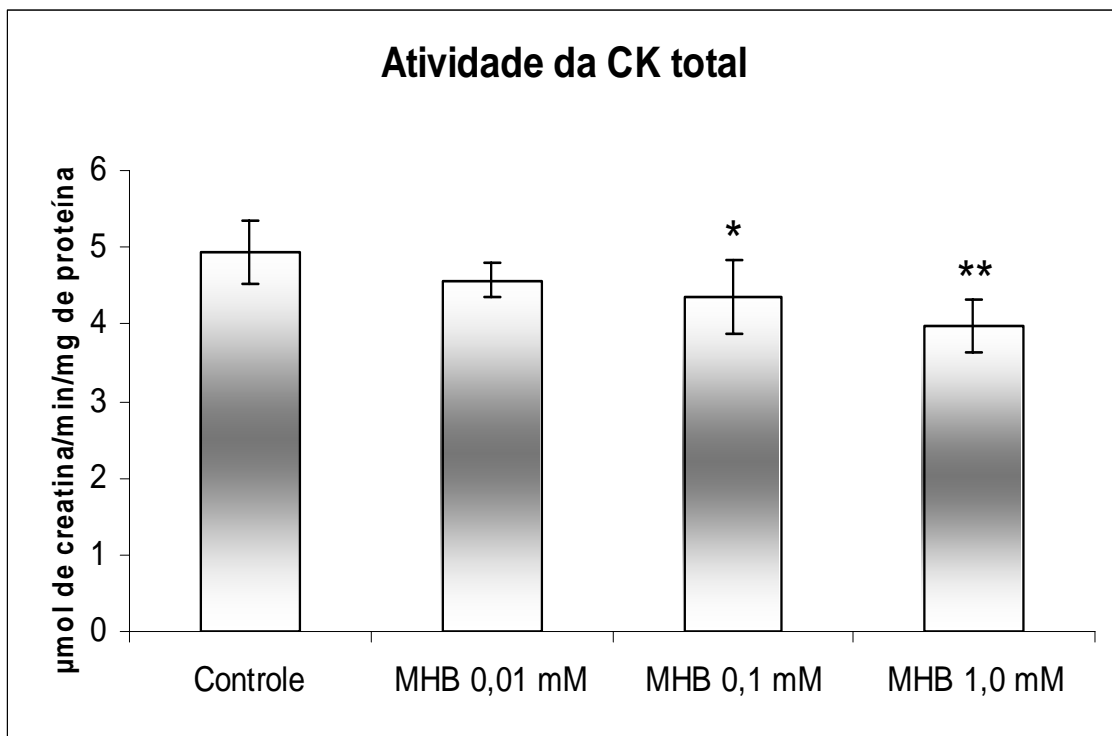


**Figura IV.19.** Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxibutírico (MHB) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em membranas plasmáticas sinápticas de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=5). Os resultados foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Não houve diferença significativa entre os grupos.

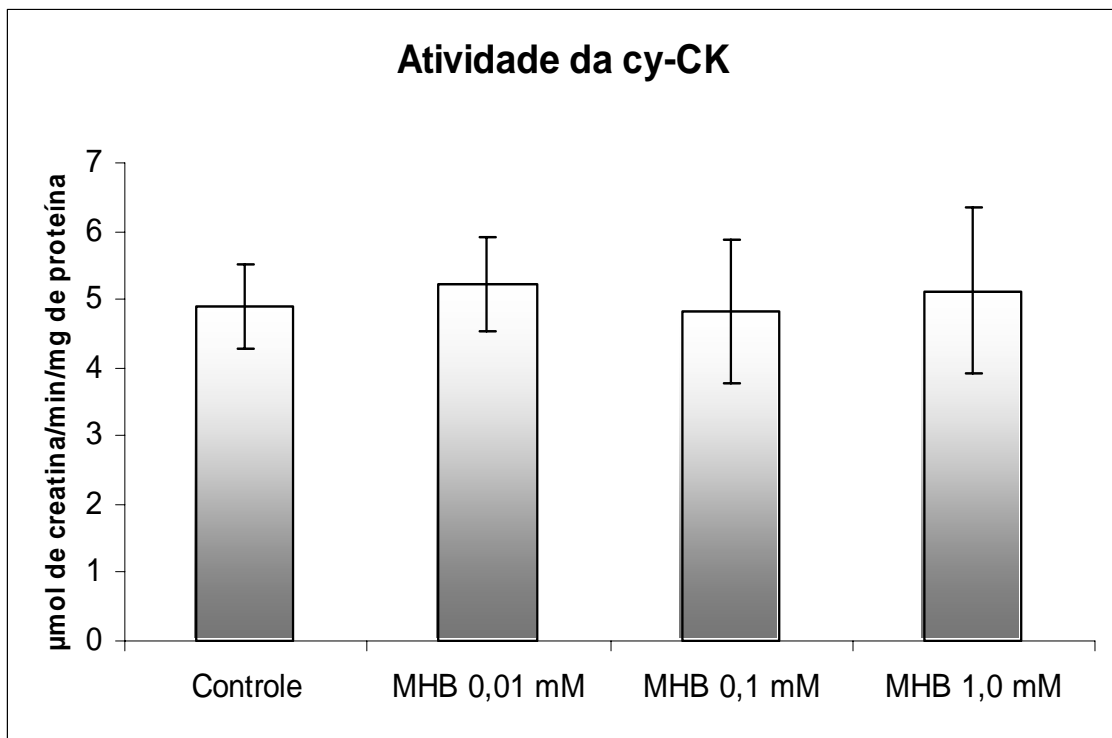
#### **IV. 2. 4 Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre as atividades da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

A figura IV.20 mostra que o MHB inibiu significativamente a atividade total da creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas concentrações de 0,1 e 1,0 mM [ $F(3,20)=6,695$ ;  $p<0,01$ ]. Partindo do efeito encontrado na CK total, passamos a investigar o efeito do MHB sobre a atividade da enzima nas frações citosólica (cy-CK) e mitocondrial (mi-CK). A figura IV.21 mostra que o MHB não exerceu nenhum efeito sobre a atividade da cy-CK [ $F(3,20)=0,251$ ;  $p>0,05$ ]. Por outro lado, a figura IV.22 mostra a inibição significativa da mi-CK na presença de 1,0 mM de MHB [ $F(3,20)=4,102$ ;  $p<0,05$ ]. Considerando a possibilidade do efeito inibitório encontrado ter como causa a oxidação de grupamentos tióis essenciais à atividade da enzima, investigamos o efeito do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e do inibidor da óxido nítrico sintase N<sup>o</sup>-nitro-L-argininametiléster (L-NAME) sobre a inibição provocada pelo MHB na atividade da CK total e o efeito do GSH sobre a inibição da atividade da mi-CK causada pelo ácido. A figura IV.23 mostra uma prevenção do efeito inibitório causado pelo MHB sobre a atividade da CK total na presença de GSH e L-NAME [ $F(5,30)=5,722$ ;  $p<0,01$ ]. A figura IV.24 mostra que o GSH preveniu o efeito inibitório causado pelo MHB sobre a atividade da mi-CK [ $F(3,20)=4,050$ ;  $p<0,05$ ].



**Figura IV.20. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxibutírico (MHB) sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

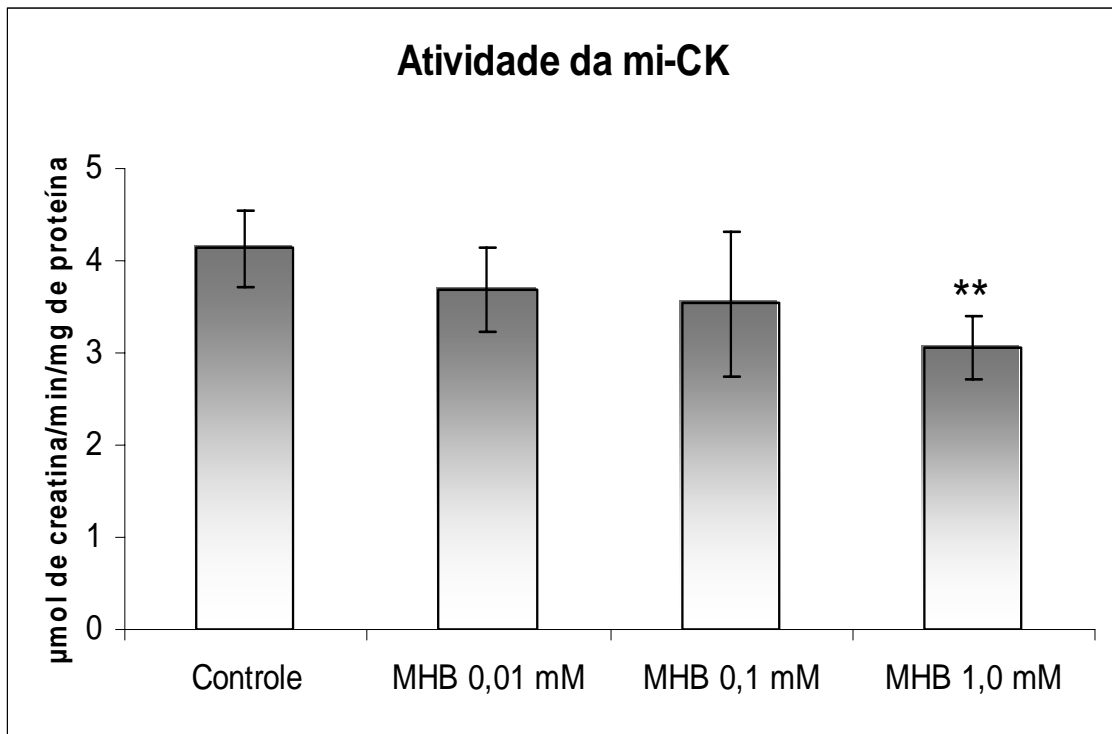
Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\* $p < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , comparado ao controle).



**Figura IV.21. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase citosólica (cy-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

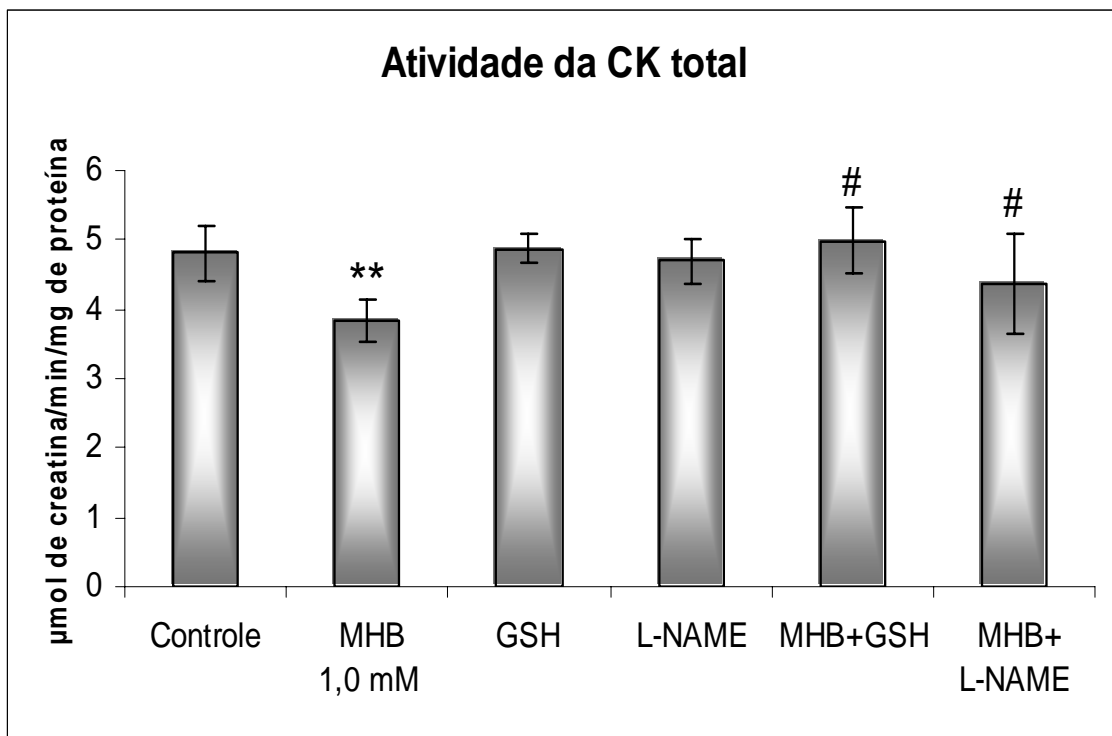
Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.





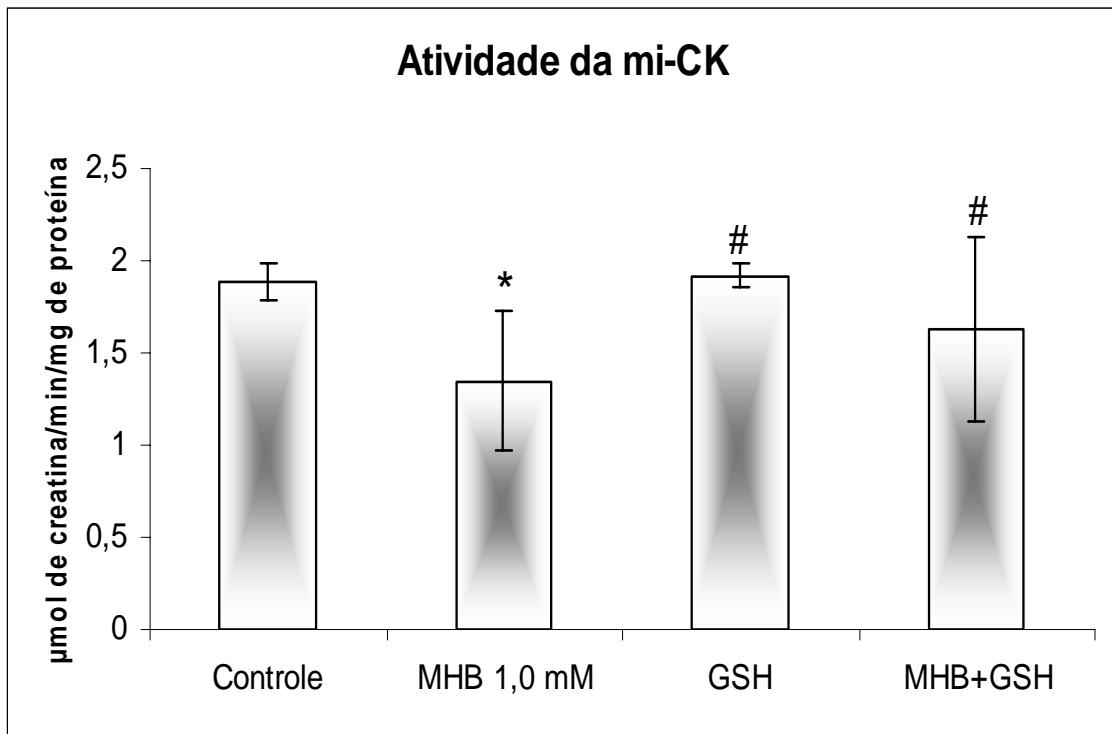
**Figura IV.22. Efeito *in vitro* do ácido 2-metil-3-hidroxibutírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial (mi-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*\*P<0,01, comparado ao controle).



**Figura IV.23. Efeito *in vitro* da glutatona reduzida (GSH) e do N<sup>o</sup>-nitro-L-argininametiléster (L-NAME) sobre o efeito inibitório do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade total da creatina quinase (CK total) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\*\*p<0,01, comparado ao controle; #p<0,05, comparado ao MHB 1,0 mM).



**Figura IV.24. Efeito *in vitro* da glutatona reduzida (GSH) sobre o efeito inibitório do ácido 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial (mi-CK) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.**

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão (n=6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (\* $p < 0,05$ , comparado ao controle; # $p < 0,05$ , comparado ao MHB 1,0 mM).

## V DISCUSSÃO

A deficiência da  $\beta$ -cetotilase mitocondrial é um distúrbio hereditário autossômico recessivo do catabolismo da isoleucina (MITCHELL e FUKAO, 2001). Esta enzima catalisa o último passo da degradação da isoleucina e tem papel chave no metabolismo dos corpos cetônicos, estando envolvida tanto na síntese (fígado) quanto no catabolismo destes compostos (tecidos extrahepáticos) (MIDDLETON, 1978). Essa doença é caracterizada bioquimicamente pela excreção urinária aumentada dos ácidos 2-metilacetoacético (MAA), 2-metil-3-hidroxi-butírico (MHB) bem como da tigililglicina (TG) (SØVIK, 1993; MITCHELL e FUKAO, 2001).

Existe uma grande variabilidade fenotípica nesta desordem, há pacientes que apresentam desenvolvimento físico e aptidões intelectuais normais (KREMER et al., 1997) e outros com severo atraso físico e mental (DAUM et al., 1973). Os achados mais comumente presentes são cetose, acidose metabólica, vômitos e desidratação. Outras manifestações são descritas na literatura, mostrando alterações de estruturas cerebrais (MITCHELL e FUKAO, 2001), bem como convulsões (KREMER et al., 1997), além de acidose láctica durante crises de descompensação metabólica (ARAMAKI et al., 1991).

A acidúria 2-metil-3-hidroxi-butírica, descrita pela primeira vez por Zschocke et al. (2000), apresenta um curso clínico distinto da deficiência da  $\beta$ -cetotilase. Este novo distúrbio metabólico, de herança ligada ao cromossomo X, caracteriza-se por uma progressiva neurodegeneração associada à atrofia cortical cerebral, convulsões, cegueira, retardo mental, prejuízo psicomotor e hipotonia generalizada. Os achados bioquímicos mostram severa acidose láctica e hiperamonemia, bem como excreção urinária aumentada de MHB e de TG, porém não de MAA, o que a

diferencia da deficiência da  $\beta$ -cetotiolase (ZSCHOCKE et al., 2000; OFMAN et al., 2001; OLPIN et al., 2002).

Tendo em vista que o mecanismo fisiopatogênico do dano cerebral destas desordens é totalmente desconhecido, que o padrão de excreção dos metabólitos possivelmente tóxicos apresenta grande similaridade e que alguns achados bioquímicos, tais como a acidemia láctica, sugerem um déficit na produção de energia pelos pacientes, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do MAA e do MHB sobre alguns parâmetros do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

Nossos resultados demonstraram inicialmente que o MAA, metabólito acumulado apenas na deficiência da  $\beta$ -cetotiolase, inibiu significativamente a produção de  $\text{CO}_2$  por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens a partir de glicose (cerca de 35% na concentração de 1 mM) e nas concentrações de 0,1 e 1 mM (23% e 35% respectivamente) a partir de acetato. Considerando que o MAA é um ácido monocarboxílico e poderia competir com o acetato e com o piruvato derivado da glicose pelo mesmo transportador de membrana impedindo assim a entrada e posterior oxidação destas substâncias na mitocôndria, decidimos verificar a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de citrato, composto que utiliza o sistema de transporte dos ácidos tricarboxílicos da membrana mitocondrial. Nossos experimentos demonstraram uma inibição em torno de 30% na produção de  $\text{CO}_2$  a partir de citrato em todas as concentrações de MAA testadas (0,01, 0,1 e 1 mM), sugerindo que a diminuição da produção de  $\text{CO}_2$  a partir dos três substratos provavelmente reflete uma inibição real do ciclo do ácido cítrico. Não se pode também descartar uma inibição primária da cadeia respiratória com inibição secundária do ciclo de Krebs por aumento na relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Por outro lado, uma inibição da via glicolítica

pelo MAA também pode ter ocorrido, mas não foi investigada no presente trabalho. Nossos ensaios não afastam a possibilidade de que o MAA possa se ligar à coenzima A, seqüestrando este composto que é essencial para a metabolização do acetato e da glicose até CO<sub>2</sub>. No entanto, é pouco provável que isto tenha ocorrido, visto que a oxidação de citrato não necessita de CoA e também foi inibida pelo ácido. Baseados nestes achados, investigamos o efeito do MAA sobre os complexos da cadeia respiratória. O MAA inibiu o complexo II da cadeia respiratória (em torno de 12%) bem como a enzima succinato desidrogenase (SDH) (em cerca de 18%) não afetando as atividades dos outros complexos estudados. A inibição da cadeia respiratória poderia, portanto, explicar o bloqueio do ciclo de Krebs causado pelo MAA. Considerando que o metabolismo energético cerebral é essencialmente aeróbico, é possível que as inibições causadas pelo MAA encontradas em nossos estudos possam comprometer a formação de ATP no cérebro e ser relevante para explicar a sintomatologia dos pacientes afetados pela deficiência da β-cetotiolase, bem como o aumento do lactato plasmático observado especialmente durante as crises de descompensação metabólica, quando os níveis dos metabólitos aumentam marcadamente (ARAMAKI et al., 1991). Estudamos também o efeito do MAA sobre as atividades das enzimas Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e creatina quinase que estão envolvidas diretamente no metabolismo energético. Ambas enzimas não foram afetadas pelo ácido.

Posteriormente foi investigado o efeito do MHB, metabólito que se acumula nas deficiências da β-cetotiolase e da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD), sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de vários substratos, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos. Verificamos que o MHB inibiu significativamente a produção de CO<sub>2</sub> a partir de

glicose em todas as concentrações testadas (19% para 0,01 mM, 33% para 0,1 mM e 42% para 1 mM do ácido) de forma dose-dependente. Quando o substrato foi o acetato, observou-se uma inibição significativa da produção de CO<sub>2</sub> novamente em todas as concentrações do metabólito da ordem de 27% a 43%. Para descartar uma possível competição do MHB com o acetato e com o piruvato pelo mesmo transportador de membrana mitocondrial, foram também realizados ensaios utilizando o citrato como fonte de carbono para a produção de CO<sub>2</sub>. Verificamos que o MHB inibiu a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato nas três concentrações testadas (25% para 0,01 mM, 40% para 0,1 mM e 44% para 1 mM do MHB). Estes resultados sugerem que o MHB inibe o ciclo do ácido cítrico onde é produzido o CO<sub>2</sub>. Portanto, poder-se-ia presumir que o bloqueio do ciclo de Krebs possa ser traduzido em diminuição da síntese de ATP, com prejuízo do metabolismo energético cerebral. Não podemos descartar uma inibição primária da cadeia respiratória com inibição conseqüente do ciclo de Krebs. Nossos resultados não afastam uma inibição da via glicolítica. Estudos posteriores devem ser feitos para testar esta hipótese. Assim, determinamos o efeito do MHB sobre as várias atividades enzimáticas da cadeia respiratória. Verificamos que o complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia respiratória foi inibido significativamente pelo MHB, o que poderia explicar a diminuição da síntese de CO<sub>2</sub> verificada nos ensaios anteriores. Achados prévios da literatura descrevem uma inibição moderada dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória em fibroblastos de pacientes portadores da deficiência da MHBD (OLPIN et al., 2002; BURLINA et al., 1998). Esses resultados *in vivo* concordam parcialmente com nossos resultados *in vitro*. Embora não saibamos as razões pelas quais não encontramos uma inibição significativa dos outros complexos da cadeia respiratória, os resultados do presente trabalho e os achados anteriores indicam

fortemente que a cadeia respiratória está inibida de forma moderada na deficiência de MHBD. Poder-se-ia presumir que o outro metabólito acumulado na deficiência de MHBD, a tigililglicina, possa inibir os complexos I, II e III. Por outro lado, importantes achados foram descritos por Bennett et al. (1993), demonstrando que pacientes com deficiência primária do complexo I acumulam MHB e TG, sugerindo, portanto, uma associação entre as enzimas  $\text{NAD}^+$ -dependentes do catabolismo da isoleucina e a atividade do complexo I. Nesse particular, Olpin et al. (2002) pressupõem que os achados clínicos e bioquímicos da deficiência da MHBD sejam secundários à redução da atividade da cadeia respiratória. Portanto, nossos resultados aliados aos de outros investigadores apontam fortemente para uma deficiência da atividade do transporte de elétrons pela cadeia respiratória, com conseqüente comprometimento do metabolismo energético cerebral. Assim, a hipotonia generalizada e os elevados níveis de lactato encontrados no plasma e/ou líquido dos pacientes portadores da deficiência de MHBD poderiam ser secundários ao déficit energético (ZSCHOCKE et al., 2000, ENSENAUER et al. 2002 e OLPIN et al. 2002).

Por outro lado, o MHB demonstrou não ter efeito direto sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos, ao contrário da atividade total da creatina quinase (CK total) que foi inibida significativamente por esse ácido orgânico nas concentrações de 0,1 e 1 mM (12% e 20% respectivamente). Partindo deste achado, investigamos o efeito do MHB sobre as isoenzimas citosólica e mitocondrial da creatina quinase. O MHB inibiu a atividade da creatina quinase mitocondrial (mi-CK) na concentração de 1 mM (cerca de 27%), não alterando a atividade da isoenzima citosólica (cy-CK). Nossos resultados demonstram uma inibição seletiva da creatina quinase mitocondrial. A mi-CK é parte integrante do sistema de tamponamento energético celular, estando envolvida



também na regulação do poro de permeabilidade mitocondrial, cuja abertura modula a apoptose celular (CROMPTON, 1999; SCHLATTNER e WALLIMANN, 2000).

Recentes estudos têm demonstrado que a atividade da CK se encontra diminuída após exposição a agentes geradores de espécies reativas, como evidenciado na rápida oxidação do grupamento tiol da Cys<sup>278</sup> da CK de ratos por peroxinitrito (KONOREV, HOGG e KALYANARAMAN, 1998; STACHOWIAK et al., 1998; WOLOSKER, PANIZZUTTI e ENGLENDER, 1996). Outras substâncias são capazes de reagir diretamente com os grupamentos tióis da CK, interferindo com esta atividade enzimática (GROSS et al., 1996). Portanto, investigamos o efeito do antioxidante natural glutatona reduzida (GSH) (principal defesa antioxidante do cérebro de mamíferos) e do inibidor da enzima óxido nítrico sintase N $\omega$ -nitro-L-argininametiléster (L-NAME) sobre a inibição da CK total causada pelo MHB. Tanto a GSH quanto o L-NAME preveniram totalmente o efeito inibitório do MHB. Sendo a GSH um protetor natural de grupamentos tióis, é possível inferir que a inibição da atividade da CK total pelo MHB esteja relacionada à oxidação dos grupos tióis que possuem um papel essencial na atividade da enzima creatina quinase. Por outro lado, a prevenção observada com o L-NAME sugeriria a participação das espécies reativas do óxido nítrico ou do peroxinitrito nesta ação.

Investigamos também o efeito da GSH sobre a inibição da mi-CK causada pelo MHB. Conforme nossos resultados, a presença de GSH preveniu totalmente a inibição da enzima causada pelo metabólito. A molécula de mi-CK pode se configurar com duas isoformas interconversíveis, uma dimérica e outra octamérica (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). A mi-CK octamérica é considerada a forma ativa *in vivo* (SOBOLL et al, 1999) e a dissociação dos octâmeros pode interferir na função da enzima (SCHLATTNER e WALLIMANN, 2000; KHUCHUA et al., 1998).

Como os grupamentos tióis presentes na enzima desempenham um papel importante na formação do octâmero (LIPSKAYA, 2001), é possível sugerir que o MHB, através da oxidação destes grupamentos, possa desestabilizar a estrutura octamérica da mi-CK alterando a atividade enzimática.

O funcionamento do cérebro depende de níveis constantes e elevados de ATP. Situações como a hipóxia e hipoglicemia podem levar a um dano irreversível e até mesmo a morte neuronal pela incapacidade celular de manter um gradiente iônico dependente de bombas que utilizam energia para a sua atividade. A energia necessária para manutenção das funções cerebrais bem como do gradiente iônico está diretamente relacionada à glicólise e à fosforilação oxidativa que, em condições normais, atuam em conjunto (SILVER, DEAS e ERECINSKA, 1997). A manutenção das atividades dos complexos da cadeia respiratória é essencial para o funcionamento normal do cérebro. Assim, algumas doenças genéticas e outros distúrbios que inibam a fosforilação oxidativa geram um acúmulo de NADH que por sua vez inibe o ciclo de Krebs favorecendo a conversão de piruvato em lactato o qual se encontra aumentado no plasma dos indivíduos afetados (VOET e VOET, 1990; WALLACE, 1999; SCHAPIRA, 1995). A manutenção do gradiente iônico transmembrana é efetuado pela enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994) e alterações nos mecanismos que mantêm o equilíbrio destes íons entre os meios intra e extracelulares podem causar graves conseqüências ao cérebro (ERECINSKA e SILVER, 1994). Nossos resultados não demonstraram inibição direta da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pelo MAA e pelo MHB. No entanto, devemos considerar que os ensaios *in vitro* para a medida dessa atividade são feitos com excesso de ATP. Portanto, não podemos afastar a hipótese de que a falta de ATP diminuiria a atividade dessa enzima.

Por outro lado, o sistema da creatina/creatina quinase/fosfocreatina (Cr/CK/PCr) desempenha um importante papel no tamponamento dos níveis de ATP bem como no transporte intracelular de grupamentos “fosfato de alta energia” nos tecidos dependentes de grande demanda energética (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). A fosforilação oxidativa, o sistema da creatina quinase e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase atuam de forma integrada. Possíveis alterações em um ou mais desses sistemas podem influenciar o funcionamento dos outros.

Devemos considerar que várias doenças da cadeia respiratória caracterizam-se clinicamente por sintomas neurológicos (encefalopatia) e musculares (hipotonia), achados característicos das doenças, em especial da deficiência da MHBD, em que o MHB está acumulado (WALLACE, 1999; SCHAPIRA, 1998). Além disso, deficiências das atividades da creatina quinase e da fosforilação oxidativa têm sido verificadas em várias doenças neurodegenerativas comuns, tais como doenças de Alzheimer e Parkinson (SCHAPIRA, 1998; SCHAPIRA et al, 1990).

Considerando a estrita relação existente entre os parâmetros do metabolismo energético estudados no presente trabalho e no caso destes achados se confirmarem nas deficiências da  $\beta$ -cetotilase e da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD), podemos inferir que o bloqueio do ciclo do ácido cítrico e da cadeia respiratória, juntamente com a inibição do sistema Cr/CK/PCr, possam ser responsáveis, ao menos em parte, pelo dano neurológico característico dos portadores destas doenças.

## VI CONCLUSÕES

– O ácido 2-metilacetoacético (MAA) inibiu significativamente a produção de  $\text{CO}_2$  por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens na concentração de 1 mM a partir de glicose, nas concentrações de 0,1 e 1 mM a partir de acetato e nas três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1 mM) a partir de citrato.

– O MAA na concentração de 1 mM inibiu significativamente o complexo II da cadeia respiratória bem como a enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

– O MAA na concentração de 1 mM não alterou a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos jovens.

– O MAA nas concentrações de 0,01 a 1 mM não alterou a atividade total da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

– O ácido 2-meti-3-hidroxi-3-butírico (MHB) inibiu significativamente a produção de  $\text{CO}_2$  por homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens nas três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1 mM) a partir de glicose, acetato e citrato. A inibição encontrada a partir de glicose mostrou-se dose-dependente.

– O MHB, na concentração de 1 mM, inibiu significativamente o complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

- O MHB na concentração de 1 mM não alterou a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas sinápticas plasmáticas de córtex cerebral de ratos jovens.
  
- O MHB inibiu significativamente a atividade total da enzima creatina quinase nas concentrações de 0,1 e 1 mM e a atividade da isoenzima mitocondrial na concentração de 1 mM, não alterando a atividade da isoenzima citosólica em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
  
- O efeito inibitório do MHB sobre a atividade total da creatina quinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens foi totalmente prevenido pela adição de GSH ou L-NAME no meio de incubação. A GSH preveniu o efeito inibitório do MHB sobre a atividade da isoenzima mitocondrial em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.
  
- Nossos resultados, demonstrando uma inibição do ciclo de Krebs, da cadeia respiratória e da creatina quinase pelos metabólitos acumulados na deficiência da  $\beta$ -cetotiolase e/ou na deficiência da 2-metil-3-hidroxi-butiril-CoA desidrogenase (MHBD), sugerem que esses ácidos orgânicos inibam o metabolismo energético cerebral, o que pode estar relacionado com o comprometimento cerebral dos pacientes afetados por estas doenças.

## VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENCKS, W. P. **Biochemistry**. London: Jones and Bartlett, p. 603-632, 1992.

AKSENOV, M; AKSENOVA, M; BUTTERFIELD, D. A. et al. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **J. Neurochem.** v. 74, p. 2520-2527, 2000.

ARAMAKI, S.; LEHOTAY, D.; SWEETMAN, L. et al. Urinary excretion of 2-methylacetoacetate, 2-methyl-3-hydroxybutyrate and tiglylglycine after isoleucine loading in the diagnosis of 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 14, p. 63-74, 1991.

BENNETT, M. J.; SHERWOOD, W. G.; GIBSON, K. M. et al. Secondary inhibition of multiple NAD-requiring dehydrogenases in respiratory chain complex I deficiency: possible metabolic markers for the primary defect. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 16, p. 560-562, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BÜRGER, C. Estudos experimentais na Doença do Xarope do Bordo: Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada e seus cetoácidos na atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

BURLINA, A. B.; GIBSON, K. M.; RUITENBEEK, W. et al. Profound neurological phenotype in a patient presenting with disordered isoleucine and energy metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 21, p. 864-866, 1998.

CHALMERS, R. A. et al. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. **J. Inherit. Metab. Dis.** Lancaster, v. 3, p. 27-44, 1980.

CHALMERS, R. A.; LAWSON, A. M. **Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias**. London: Chapman & Hall, p. 221-229, 1982.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. **Anal. Biochem.** v. 157, p. 375-380, 1986.

CLARK, J. B.; BATES, T. E.; CULLINGFORD, T. et al. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci-Basel.** v. 17, p. 174-180, 1993.

CREMER, J. E.; BRAUN, L. D.; OLDENDORF, W. H. Changes during development in transport process of the blood-brain barrier. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 448, p. 633-637, 1976.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.** v. 341, p. 233-249, 1999.

CRONE, C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **J. Physiol. (Lond)** v. 181, 103-106, 1965.

da SILVA, C. G.; BUENO, A. R. F.; SCHUCK, P. F. et al. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. **Neurochem. Int.** v. 44, p. 45-52, 2004.

DAUM, R. S.; MAMER, O. A.; LAMM, P. H. et al. R. A "new" disorder of isoleucine catabolism. **Lancet.** v. 2, p. 1289-1290, 1971.

DAUM, R. S.; SCRIVER, C. R.; MAMER, O. A. et al. An inherited disorder of isoleucine catabolism causing accumulation of  $\alpha$ -methylacetoacetate and  $\alpha$ -methyl- $\beta$ -hydroxybutyrate, and intermittent metabolic acidosis. **Pediatr. Res.** v. 7, p. 149-160, 1973.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: Pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 23, p. 247-263, 2000.

DONALDSON, J.; ST-PIERRE, J.; MINICH, J. et al. Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. **Can. J. Biochem.** v. 49, p. 1217-1224, 1977.

ENSENAUER, R.; NEIDERHOFF, H.; RUITER, J. P. N. et al. Clinical variability in 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Ann. Neurol.** v. 51, p. 656-659, 2002.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** v. 43, p. 37-71, 1994.

FISCHER, J. C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J. A. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta.** v. 153, p. 23-36, 1985.

FONTAINE, M.; BRIAND, G.; SER, N. et al. Metabolic studies in twin brothers with 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. **Clin. Chim. Acta.** v. 255, p. 67-83, 1996.

GEERING, K. Subunit assembly and functional maturation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. **J. Membrane Biol.** v.155, p. 109-121, 1990.

GIBSON, K. M.; LEE, C. F.; KAMALI, V. et al. A coupled assay detecting defects in fibroblasts isoleucine degradation distal to enoyl-CoA hydratase. Application to 3-oxothiolase deficiency. **Clin. Chim. Acta.** v. 205, p. 127-136, 1992.

GROSS, W. L., BAK, M. I.; INGWALL, J. S. et al. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates heart contractile reserve. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 93, p. 5604-5609, 1996.

HANGLUND, M. M.; STHAL, W. L.; KUNKEL, D. D. et al. Developmental and regional differences in the localization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rabbit hippocampus. **Brain Res.** v. 343, p. 198-203, 1985.

HILLMAN, R. E.; KEATING, J. P. Beta-ketothiolase deficiency as a cause of the "Ketotic hyperglycinemia syndrome". **Pediatrics.** v. 53, p. 221-225, 1974.

HITSCHKE, K.; BÜHLER, R.; APELL, H. J. et al. Inactivation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by radiation-induced free radical-chain mechanism. **FEBS Lett.** v. 353, p. 297-300, 1994.

HIYAMA, K.; SAKURA, N.; MATSUMOTO, T. et al. Deficiency of beta-ketothiolase activity in leukocytes from a patient with 2-methylacetoacetic aciduria. **Clin. Chim. Acta.** v. 155, p. 189-194, 1986.

HOFFMANN, G. F.; GIBSON, K. M.; TREKS, F. K. et al. Neurological manifestation of organic acid disorders. **Eur. J. Pediatr.** v. 153, p. 94-100, 1994.

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.** v. 7, p. 597-603, 1962.

JACOBSON, I. R.; HAGBERG, H.; SANDBERG, M. et al. Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb in vivo. **Neurosci. Lett.** v. 64, p. 211-215, 1986.

JONES, D. H.; MATUS, A. I. Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 356, p. 276-287, 1974.

KALDIS, P.; STOLZ, M.; WYSS, M. et al. Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. **J. Cell. Sci.** v. 109, p. 2079-2088, 1996.

KEATING, J. P.; FEIGIN, R. D.; TENENBAUM, S. M. et al. Hyperglycinemia with ketosis due to a defect in isoleucine metabolism: A preliminary report. **Pediatrics.** v. 50, p. 890-895, 1972.

KHUCHUA, Z. A.; QIN, W.; BOERO, J. et al. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 22990-22996, 1998.

KONOREV, E. A.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. **FEBS Lett.** v. 427, p. 171-174, 1998.



KREMER, R. D.; BOLDINI, C. D.; KELLEY, R. I. et al. Deficiencia de la 2-metilacetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial en Argentina. **Medicina**. v. 57, p. 52-58, 1997.

LEES, G. J.; LEHMANN, A.; SANDBERG, M. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibition, in the rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** v. 120, p. 159-162, 1990.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **J. Biochem. Chem.** v. 269, p. 196599-196662, 1994.

LIPSKAYA, T. Y. Mitochondrial creatine kinase: properties and function. **Biochemistry**. v. 66, p. 1361-1376, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

MANOS, P.; BRIAN, G. K.; EDMOND, J. Creatine kinase activity in postnatal rat brain development and in cultured neurons, astrocytes and oligodendrocytes. **J. Neurochem.** v. 56, p. 2101-2107, 1991.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 21-26, 1996a.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 27-34, 1996b.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach**. Lippincott Williams & Wilkins, p. 291-309, 1996c.

MAYATEPEK, E.; HOFFMANN, G. F.; BAUMGARTNER, R. et al. Atypical vitamin B<sub>12</sub>-unresponsive methylmalonic aciduria in a sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? **Eur. J. Pediatr.** v. 155, p. 398-403, 1996.

MERINERO, B.; PÉREZ-CERDÁ, C.; GARCIA, M. J. et al.  $\beta$ -Ketothiolase deficiency: Two siblings with different clinical conditions. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 10, suppl. 2, p. 276-278, 1987.

MIDDLETON, B. Enzymatic aspects of ketone body metabolism: the role of mitochondrial acetoacetyl Coa thiolase isoenzymes. In: SØLIN, H. D.; SENFERT, C. D. Eds. **Biochemical and Clinical Aspects of Ketone Body Metabolism**. Stuttgart: Georg Thieme, p. 1-9, 1978.

MIDDLETON, B. The oxoacyl-coenzyme A thiolases of animal tissues. **Biochem. J.** v. 132, p. 717-730, 1973.

MIDDLETON, B.; BARTLETT, K. The synthesis and characterization of 2-methylacetoacetyl coenzyme A and its use in the identification of the site of the defect in 2-methylacetoacetic and 2-methyl-3-hydroxybutyric aciduria. **Clin. Chim. Acta.** v. 128, p. 291-305, 1983.

MILLER, A. L.; KINEY, C. A.; CORDDRY, D. H. et al. Interactions between glucose and ketone body use by developing brain. **Dev. Brain Res.** v. 4, p. 443-450, 1982.

MITCHELL, G. A.; FUKAO, T. Inborn errors of ketone body metabolism. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SKY, W. S. et al. (Eds.). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** 8. ed. New York: McGraw-Hill. v. 2, p. 2328-2356, 2001.

MIYAZAWA, S.; OSUMI, T.; HASHIMOTO, T. The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes. **Eur. J. Biochem.** v. 103, p. 589-596, 1980.

MOLLOY, G. R.; WILSON, C. D.; BENFIELD, P. et al. Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. **J. Neurochem.** v. 59, p. 1932-1952, 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 3. ed. New York: Worth Publishers, p. 623-658, 2000a.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 3. ed. New York: Worth Publishers, p. 659-721, 2000b.

OFMAN, R.; FREESTRA, M.; RUITER, J. P. N. et al. 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase: purification of the enzyme, cloning of the cDNA and resolution of the molecular basis of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 24, suppl. 1, p. 60, abstract 120-O, 2001.

OLPIN, S. E.; POLLITT, R. J.; McMENAMIN, J. et al. 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in a 23-year-old man. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 25, p. 477-482, 2002.

RAPPORT, R. L.; HARRIS, A. B.; FRIEL, P. N. et al. Human epileptic brain. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and phanytoin concentration. **Arch. Neurol.** v. 33, p. 549-554, 1975.

RASHED, M.; OZAND, P. T.; A QEEL, A. et al. Experience of King Faisal specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders. **Brain Develop.** v. 16 (supp I), p. 1-6, 1994.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin. Chim. Acta.** v. 228, p. 35-51, 1994.

SCHAPIRA, A. H. Human complex I defects in neurodegenerative diseases. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 1364, p. 261-270, 1998.

SCHAPIRA, A. H. Nuclear and mitochondrial genetics in Parkinson's disease. **J. Med. Genet.** v. 32, p. 411-414, 1995.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 54, p. 823-827, 1990.

SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 17314-17320, 2000.

SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SKY, W. S. et al. (Eds). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** 8. ed. New York: McGraw-Hill, p. 3-45, 2001.

SILVER, I. A.; DEAS, J.; ERECINSKA, M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. **Neuroscience.** v. 78, p. 589-601, 1997.

SOBOLL, S.; BRDICZKA, D.; JAHNKE, D. et al. Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 31, p. 857-866, 1999.

SØVIK, O. Mitochondrial 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency: an inborn error of isoleucine and ketone body metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 16, p. 46-54, 1993.

STACHOWIAK, O.; DOLDER, M.; WALLIMANN, T. et al. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 16694-16699, 1998.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 481-499, 1996a.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501-528, 1996b.

SUTTON, V. R.; O'BRIEN, W. E.; CLARK, G. D. et al. 3-Hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 26, p. 69-71, 2003.

SWEETMAN, L.; WILLIAMS, J. C. Branched chain organic acidurias. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SKY, W. S. et al. (Eds.). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** 8. ed. New York: McGraw-Hill. v. 2, p. 2125-2163, 2001.

TSAKIRIS, S.; ANGELOGIANNI, P.; SCHULPIS, K. et al. Protective effect of L-Cysteine and Glutathione on Rat Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Inhibition Induced by Free Radicals. **Z. Naturforsch.** v. 55, p. 271-277, 2000.

TSAKIRIS, S.; DELICONSTANTINUS, G. influence of phosphatidylserine on (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membrane. **Biochem. J.** v. 22, p. 301-307, 1984.

UCHIDA, Y.; IZAI, K.; ORII, T. et al. Novel fatty acids beta-oxidation enzymes. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 1034, 1992.

VICARIO, C.; ARIZMENDI, C.; MALLOCH, G. D. A. et al. Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. **J. Neurochem.** v. 57, p. 1700-1707, 1991.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry.** New York: John Wiley & Sons, p. 528-560, 1990.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** v. 283, p. 1482-1487, 1999.

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

WOLOSKER, H.; PANIZZUTTI, R.; ENGLENDER, S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. **FEBBS Lett.** v. 392, p. 274-276, 1996.

WYSE, A. T. S.; BOLOGNESI, G.; BRUSQUE, A. M. et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. **Med. Sci. Res.** v. 23, p. 261-262, 1995.

WYSE, A. T. S.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G. et al. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase from brain cortex by propionic acid. **Neuroreport.** v. 9, p. 1719-1721, 1998.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiol. Rev.** v. 80, p. 1107-1213, 2000.

ZSCHOCKE, J.; RUITER, J. P. N.; BRAND, J. et al. Progressive infantile neurodegeneration caused by 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: a novel inborn error of branched-chain fatty acid and isoleucine metabolism. **Pediatric Research.** v. 48, p. 852-855, 2000.