

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

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA PÓS-  
NATAL DOS ÁCIDOS PROPIÔNICO E  
METILMALÔNICO SOBRE O COMPORTAMENTO  
DE RATOS NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS  
(WATER MAZE) E SOBRE ALGUNS PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
HIPOCAMPO**

**LETÍCIA FERREIRA PETTENUZZO**

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner**

**Porto Alegre**

**2001**

*A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

Aos meus pais e minha avó.

## ***Agradecimentos:***

Ao meu orientador, prof. Moacir pela oportunidade, confiança, orientação e paciência.

Ao prof. Dutra por toda colaboração em relação aos radicais livres.

Ao prof. Alex pela oportunidade de trabalhar com o water maze e pela ajuda com a análise dos resultados comportamentais.

Ao prof. Clóvis por “ensinar a pensar”.

À profª Ângela pelos “bons fluidos”

À Vânia que me trouxe para o grupo

À Ana pela amizade e aprendizado

À Fernanda e Ângela pelo auxílio com a tarefa do water maze.

Aos companheiros do laboratório: Karina, Renata, Dênis, Alexandra, Guilhian, Cesar, Rafael, Cleide e Vilson pela amizade, dicas e apoio moral.

À Patrícia, bolsista de iniciação científica que me acompanhou durante toda trabalho, pela amizade, dicas, ajuda na execução das técnicas e muito, mas muito, apoio moral.

À todos os professores do departamento.

À Cléia e pessoal do CEPEA.

Aos meus pais pelo apoio incondicional.

Ao Alexandre pelo apoio moral e por me guiar pelos nebulosos caminhos do Word/ Power Point.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS, PROPESQ e UFRGS.

## RESUMO

As acidemias propiônica e metilmalônica são desordens neurometabólicas hereditárias caracterizadas por progressiva deterioração neurológica, retardo mental, atraso no desenvolvimento psicomotor, convulsões e coma. A fisiopatologia do dano cerebral característico destas doenças ainda é pouco conhecida. No presente estudo investigamos o efeito de administração crônica (5<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida) dos ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MA), que são os metabólitos acumulados em maiores concentrações nos pacientes portadores das acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente, sobre o comportamento de ratos e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo no hipocampo dos animais. O comportamento dos animais foi avaliado 30 dias após o término do tratamento nas tarefas do labirinto aquático de Morris e no campo aberto. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram o potencial antioxidante total do tecido (TRAP) e a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em hipocampo, estrutura fundamental para a localização espacial, requerida na tarefa do labirinto aquático de Morris. As doses de propionato ou metilmalonato foram administradas de acordo com as preconizadas nos modelos experimentais destas acidemias, tomando em consideração o peso e da idade dos animais. Os ratos controles receberam solução salina nos mesmos volumes. A administração de PA ou MA não alterou o peso dos animais. Entretanto foi encontrado um déficit de aprendizado e memória no grupo tratado com PA, e um déficit de memória no grupo tratado com MA. Nenhum dos grupos testados apresentou alterações na atividade motora (número de cruzamentos) na tarefa do campo aberto. Também determinamos o efeito da co-administração de ácido ascórbico nos animais tratados cronicamente com PA ou MA.

Encontramos que o ácido ascórbico preveniu o déficit cognitivo provocado pela administração crônica de PA e MA.

Por outro lado, verificamos que os tratamentos crônicos com PA e MA diminuíram o TRAP no hipocampo dos ratos, sem alterar a atividade de nenhuma das enzimas testadas. A prevenção do déficit cognitivo pelo ácido ascórbico associada à diminuição do TRAP no hipocampo dos animais tratados cronicamente com PA ou MA sugere que o estresse oxidativo pode estar relacionado com o déficit cognitivo encontrado no presente trabalho. Concluindo, nossos resultados indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido, ao menos em parte, com o dano cerebral nos pacientes afetados pelas acidemias propiônica e metilmalônica.

## ABSTRACT

Propionic and methylmalonic acidemias are inherited neurometabolic disorders characterized by progressive neurological deterioration with psychomotor delay/mental retardation, convulsions and coma. The pathophysiology of these diseases is poorly unknown. In the present study we investigated the effect of chronic administration (from the 5th to the 28th day of life) of propionic (PA) and methylmalonic (MA) acids, the major metabolites accumulating in tissues of patients affected by propionic and methylmalonic acidemias, respectively, on the behavior of rats and on some biochemical parameters of oxidative stress. The animal behavior was evaluated in the Morris water maze task and in the open field task. Biochemical parameters of oxidative stress included total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and the activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. All biochemical assays were realized in the hippocampus, a fundamental cerebral structure for spatial location, which is essential to a good performance in the water maze task. PA and MA doses were administered according to experimental models of these diseases, as a function of body weight and animal age. Control rats were treated with saline in the same volumes. Chronic early PA or MA treatments had no effect on body weight. However chronic administration of PA impaired the spatial learning and memory and chronic administration of MA impaired memory of animals in the water maze task. Motor activity, evaluated by the number of crossings in the open field task, was not altered by PA or MA administration, indicating no deficit of locomotor activity in rats injected with these metabolites. We also determined the effect of ascorbic acid administered alone or combined to PA or MA on the same behavioral parameters. Ascorbic acid was able to prevent the behavioral alterations provoked by PA and MA, implying that oxidative stress may be involved in their effects.

On the other hand, we have also shown that chronic administration of PA or MA decreased the TRAP in the hippocampus of rats, without altering the activity of the tested enzymes. The results, showing a prevention of cognitive deficits by ascorbic acid and decreased of TRAP in the hippocampus provide evidence that early PA or MA treatments induce long-lasting behavioral deficits, which are possibly caused by oxygen reactive species generation.

# Índice

<b>I</b>	<b>INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>1</b>
I.1	ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	1
I.1.1	Definição .....	1
I.1.2	Classificação .....	1
I.1.3	Prevalência: .....	3
I.1.4	Sinais Clínicos e Laboratoriais .....	4
I.2	ACIDEMIAS ORGÂNICAS .....	5
I.2.1	Definição .....	5
I.2.2	Acidemias Propiônica e Metilmalônica.....	5
	Figura I.2. Rota metabólica dos ácidos propiônico e metilmalônico .....	6
I.2.3	Manifestações Clínicas.....	7
I.2.4	Achados Bioquímicos .....	7
I.2.5	Frequência.....	7
I.2.6	Fisiopatogenia.....	8
I.2.7	Diagnóstico e Tratamento .....	10
I.3	MODELOS ANIMAIS .....	11
I.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	13
I.4.1	Aprendizado e Memória .....	13
I.5	RADICAIS LIVRES .....	14
I.5.1	Definição .....	14
I.5.2	Efeitos fisiológicos dos radicais livres .....	15
I.5.3	Envolvimento de radicais livres em doenças neurodegenerativas .....	16
I.6	AGENTES ANTIOXIDANTES .....	18
I.6.1	Definição .....	18
I.6.2	Enzimas Antioxidantes.....	20
I.6.3	Ácido Ascórbico.....	21
I.6.4	Defesas antioxidantes no cérebro.....	23
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
III.1	ANIMAIS: .....	26
III.2	TRATAMENTO: .....	26
III.3	TAREFAS COGNITIVAS .....	27
III.3.1	Labirinto Aquático de Morris (water maze) .....	28
III.3.2	Tarefa do Campo Aberto .....	30
III.4	ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	33
III.4.1	Tampões.....	33
III.4.2	Preparo da amostra.....	34

III.4.3	<i>Potencial antioxidante total do tecido (TRAP)</i> .....	35
III.4.4	<i>Enzimas</i> .....	36
III.4.5	<i>Proteínas:</i> .....	37
III.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
IV.1	TAREFAS COGNITIVAS .....	39
IV.1.1	<i>Labirinto aquático de Morris- fase de aquisição (treino)</i> .....	39
IV.1.2	<i>Labirinto aquático de Morris - fase de aquisição (teste):</i> .....	40
IV.1.3	<i>Labirinto aquático de Morris - fase reversa (treino reverso):</i> .....	40
IV.1.4	<i>Labirinto aquático de Morris - fase reversa (teste reverso):</i> .....	41
IV.1.5	<i>Campo Aberto:</i> .....	41
IV.2	ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	42
IV.2.1	<i>Potencial antioxidante total (TRAP)</i> .....	42
IV.2.2	<i>Enzimas</i> .....	42
<b>V</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>VII</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## Lista de Tabelas

<i>Tabela I.1- Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvida.....</i>	<i>3</i>
<i>Tabela I. 2- Principais manifestações clínicas dos Erros Inatos do Metabolismo no período neonatal (Burton, 1987).....</i>	<i>4</i>
<i>Tabela I.3- Achados laboratoriais mais freqüentes em Erros Inatos do Metabolismo no período neonatal (Burton, 1987).....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela I.4. Efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela I.5. Motivos que tornam o cérebro especialmente vulnerável ao estresse oxidativo.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabela I.6. Antioxidantes não enzimáticos encontrados no plasma humano.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela III.1. Doses de ácido propiônico e metilmalônico administrado aos ratos durante o tratamento crônico de acordo com a idade.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela III.2. Cronograma das tarefas cognitivas.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela IV.1. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) e ácido metilmalônico + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o peso corporal dos ratos.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela IV.2. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido ascórbico (AA) e ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) sobre o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto .....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela IV.3. Efeito da administração crônica pós natal de ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA) e ácido metilmalônica + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto.....</i>	<i>46.</i>

## Lista de Figuras

<i>Figura I.1. Erros inatos do metabolismo.....</i>	<i>2</i>
<i>Figura I.2. Rota metabólica dos ácidos propiônico e metilmalônico.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura I.3. Síntese de ácido ascórbico a partir de glicose.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura III.1. Labirinto aquático de Morris.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura III.2. Campo aberto.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura IV.1. Efeito da administração crônica pós natal de PA, AA e PA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase de aquisição) na tarefa do labirinto aquático de Morris. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura IV.2. Efeito da administração crônica pós natal de MA, AA e MA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase de aquisição) na tarefa do labirinto aquático de Morris. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figura IV.3. Teste da fase de aquisição. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (expresso em porcentagem do tempo total).....</i>	<i>49</i>
<i>Figura IV.4. Teste da fase de aquisição. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (como porcentagem do tempo total).....</i>	<i>50</i>
<i>Figura IV.5. Efeito da administração crônica pós natal de PA, AA e PA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase reversa) na tarefa do labirinto aquático de Morris.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura IV.6. Efeito da administração crônica pós natal de MA, AA e MA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase reversa) na tarefa do labirinto aquático de Morris.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura IV.7. Teste da fase reversa. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (como porcentagem do tempo total).....</i>	<i>53</i>

<i>Figura IV.8. Teste da fase reversa. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (como porcentagem do tempo total).....</i>	<i>54</i>
<i>Figura IV.9. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) e ácido metilmalônica + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em hipocampo de ratos.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura IV.10. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura IV.11. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura IV.12. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima catalase.....</i>	<i>58</i>

## Lista de Abreviaturas

AA	ácido ascórbico
Ca <sup>+2</sup>	íon calcio
CAT	catalase
CuZnSOD	cobre-zinco superóxido dismutase
EIM	erros inatos do metabolismo
Fe <sup>+2</sup>	íon ferroso
Fe <sup>+3</sup>	íon férrico
GSH	glutathiona (forma reduzida)
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSSG	glutathiona (forma oxidada)
H <sup>+</sup>	íon hidrogênio
H <sub>2</sub> O	água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HO <sup>•</sup>	radical hidroxila
MA	ácido metilmalônico
MA+AA	ácido metilmalônico co-administado com ácido ascórbico
MnSOD	manganês superóxido dismutase
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)
NADH <sub>2</sub>	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida)
NO <sup>•</sup>	óxido nítrico
O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	ânion hidroxila
ONOO <sup>•</sup>	peroxinitrito
PA	ácido propiônico
PA+AA	ácido propiônico co-administado com ácido ascórbico
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TRAP	potencial antioxidante total

# I INTRODUÇÃO:

---

## I.1 Erros Inatos do Metabolismo

### I.1.1 Definição

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários devidos à mutações genéticas que resultam em anormalidades na síntese de uma proteína, geralmente uma enzima, alterando suas funções. A diminuição da atividade enzimática pode comprometer toda uma rota metabólica, acarretando um bloqueio na mesma e provocando o acúmulo de substâncias tóxicas e/ou falta de substâncias essenciais (Del Rio, 1962) (figura I.1). A expressão fenotípica dos EIM é extremamente variável. Os indivíduos afetados podem ser normais, mas usualmente apresentam severos danos físicos e principalmente no sistema nervoso central (SNC). Em alguns casos estas doenças são letais e os portadores podem não sobreviver além das primeiras horas ou semanas de vida.

Além de enzimas, outras proteínas como proteínas de transporte, receptores, hormônios peptídicos, imunoglobulinas, colágeno, fatores de coagulação e fatores de transcrição também podem estar defeituosas nos EIM.

### I.1.2 Classificação

Os EIM podem ser classificados de acordo com a área do metabolismo afetada. Assim, um erro inato onde a enzima defeituosa é necessária para a degradação de ácidos orgânicos é classificado como EIM dos ácidos orgânicos (Scriver et alli, 2001) (tabela I.1).

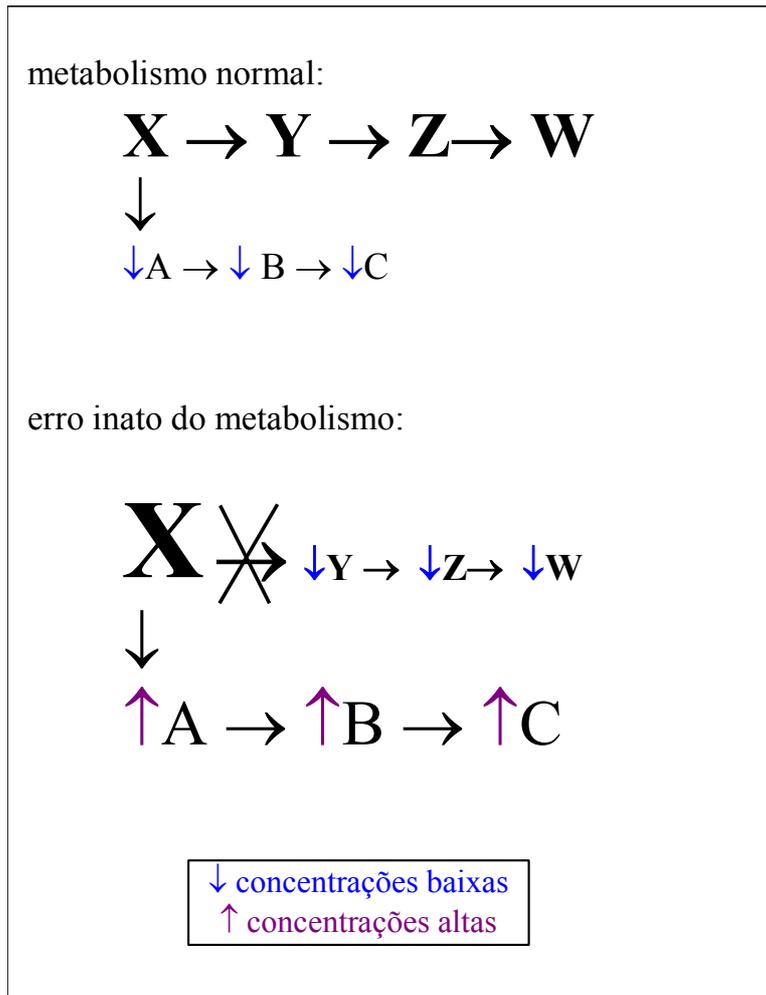


Fig I.1. Erros inatos do metabolismo. No metabolismo normal, o substrato **X** é convertido ao produto **W** após uma série de reações enzimáticas, sendo os produtos da rota secundária (A, B e C) encontrados em concentrações baixas, e às vezes indetectáveis. No EIM, uma das enzimas envolvidas na conversão de X a W está deficiente ou ausente. O acúmulo do substrato X leva a uma ativação da rota secundária, aumentando as concentrações dos derivados A, B e C que, juntamente com X, podem ser tóxicos em altas concentrações. A falta do produto W e seus intermediários também pode causar dano ao organismo.

Tabela I.1- Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvida

❖ EIM dos aminoácidos
❖ EIM dos ácidos orgânicos
❖ EIM dos glicídios
❖ EIM dos glicosaminoglicanos
❖ EIM das glicoproteínas
❖ EIM das purinas e pirimidinas
❖ EIM das enzimas eritrocitárias
❖ EIM dos metais
❖ EIM das lipoproteínas
❖ EIM dos hormônios
❖ EIM das proteínas plasmáticas

Fonte: Scriver et alli, 2001.

### I.1.3 Prevalência:

Os EIM são doenças individualmente raras, mas como grupo representam uma parte considerável dos pacientes admitidos em hospitais pediátricos.

Estudos diagnósticos cuidadosos, utilizando-se de técnicas laboratoriais avançadas e de rigoroso controle de qualidade executados na Holanda, indicam que os erros inatos do metabolismo tem uma prevalência de 1 para 600-700 crianças nascidas vivas (Blom et alli., 1989; Duran et alli., 1994; Hommes, 1994).

Outros estudos, mostrando a incidência relativa dos vários grupos de erros inatos do metabolismo, revela que aproximadamente um terço destes distúrbios corresponde a aminoacidopatias e outro terço a acidemias orgânicas, sendo que o outro terço corresponde a todos os outros (Hoffmann, 1994).

#### I.1.4 Sinais Clínicos e Laboratoriais

Embora as manifestações clínicas dos EIM sejam extremamente variáveis, existem alguns sintomas que aparecem com maior frequência nestes distúrbios. As tabelas I.2 e I.3 apresentam, respectivamente, as manifestações clínicas e laboratoriais mais frequentes nos EIM.

Tabela I. 2- Principais manifestações clínicas dos Erros Inatos do Metabolismo no período neonatal (Burton, 1987).

- ❖ Deficiência de crescimento
- ❖ Dificuldade alimentar
- ❖ Vômitos
- ❖ Diarréia
- ❖ Letargia
- ❖ Coma
- ❖ Hipotonia ou hipertonicidade
- ❖ Convulsões
- ❖ Dificuldade respiratória e apnéia
- ❖ Hepatomegalia
- ❖ Odor anormal na urina e na pele
- ❖ Anormalidades oculares
- ❖ Dismorfias (anormalidades menores)

Tabela I. 3- Achados laboratoriais mais freqüentes em Erros Inatos do Metabolismo no período neonatal (Burton, 1987).

❖ Acidose metabólica
❖ Hipoglicemia
❖ Hiperamonemia
❖ Elevação de transaminases
❖ Presença de substâncias redutoras na urina
❖ Positividade no teste do cloreto férrico
❖ Cetonúria
❖ Trombocitopenia
❖ Neutropenia
❖ Anemia
❖ Linfócitos vacuolados em esfregaço periférico

## **I.2 Acidemias Orgânicas**

### **I.2.1 Definição**

Acidemias orgânicas são distúrbios do metabolismo de aminoácidos, glicídios ou lipídios, causados por deficiência na atividade de uma enzima e caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo de um ou mais ácidos orgânicos (carboxílicos) e/ou derivados em vários tecidos e fluidos corporais dos indivíduos afetados (Chalmers e Lawson, 1982).

### **I.2.2 Acidemias Propiônica e Metilmalônica**

As acidemias propiônica e metilmalônica caracterizam-se pelo acúmulo predominantemente dos ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MA), respectivamente.

### I.2.2.1 Etiologia

A figura I.2 mostra a rota metabólica dos ácidos propiônico e metilmalônico. A deficiência da enzima propionil-CoA carboxilase causa a acidemia propiônica e a deficiência da enzima L-metilmalonil-CoA mutase a acidemia metilmalônica.

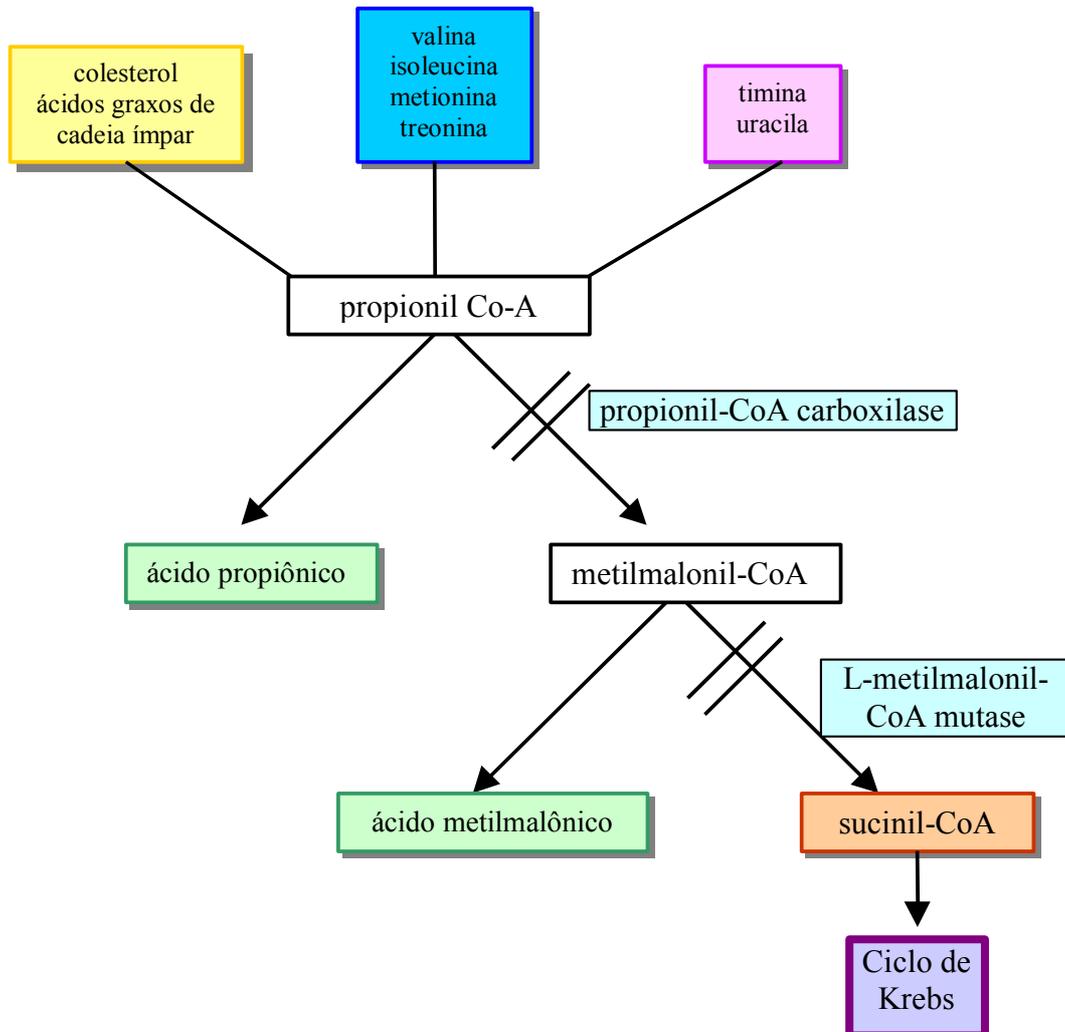


Figura I.2. Rota metabólica dos ácidos propiônico e metilmalônico

### 1.2.3 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das acidemia propiônica e metilmalônica normalmente ocorrem na primeira semana de vida e são predominantemente neurológicas, como encefalopatia aguda severa ou crônica, com letargia, hipotonia, retardo mental, atrofia cerebral, anormalidades no eletroencefalograma, apatia, coma e convulsões. Também ocorre recusa à alimentação, vômitos, desidratação e episódios de cetoacidose, apnéia e taquipnéia (Lehnert et alli, 1994; Fenton et alli, 2001).

### 1.2.4 Achados Bioquímicos

As acidemias propiônica e metilmalônica são caracterizadas por severa acidose metabólica, hiperglicinemia e hiperamonemia. Na acidemia propiônica ocorre acúmulo de vários ácidos orgânicos, tais como propionato,  $\beta$ -hidroxibutirato, metilcitrato e também de propionil-CoA (Wolf, 1981). Na acidemia metilmalônica podemos encontrar, além dos metabólitos encontrados na acidemia propiônica, o ácido metilmalônico (Fenton et alli, 2001). Também pode ser encontrado nestes pacientes deficiência de carnitina, leucopenia, anemia, trombocitopenia e acidemia láctica (Lehnert et alli, 1994)

### 1.2.5 Freqüência

As acidemias propiônica e metilmalônica estão entre as acidemias orgânicas mais freqüentes com incidência de 1 : 40.000 nascidos vivos para a propiônica (Duran et alli, 1994) e 1 : 48.000 nascidos vivos para a metilmalônica (Scriver et alli, 2001).

## 1.2.6 Fisiopatogenia

Alguns trabalhos tem demonstrado alterações no metabolismo energético causadas pelo ácido propiônico ou pelos outros metabólitos acumulados em pacientes afetados por este distúrbio. A propionil-CoA e o ácido propiônico inibem enzimas importantes na produção de energia, tais como a citrato sintase (Evangelidou et alii, 1985), o complexo piruvato desidrogenase (Gregersen, 1981), bem como as enzimas de oxidação de ácidos graxos, reduzindo desta forma a atividade do ciclo de Krebs (Glasgow & Chase, 1976). O propionato também diminui a síntese de guanosina trifosfato (GTP) (Matsuishi et alii, 1991). Estes investigadores demonstraram que a incubação de hepatócitos de ratos na presença de 5 mM de [1-C<sup>14</sup>] propionato provoca a inibição na produção energética proporcional ao acúmulo de propionil-CoA dentro da matriz mitocondrial. Todas estas inibições resultam na redução da síntese de ATP (Roe et alii, 1983).

A propionil-CoA também inibe a clivagem de glicina em serina, através da inibição da enzima serina hidroximetiltransferase. A glicina acumulada se condensa com a propionil-CoA formando a propionilglicina (Hayasaka et alii, 1982). O metabolismo dos glicídios pode estar também comprometido devido à deficiência intracelular de coenzima A acumulada sob a forma de propionil-CoA (Barash et alii, 1989; Ando, 1971).

A hiperamonemia, comum aos pacientes com acidemia propiônica, é explicada pelo efeito do propionato de reduzir a síntese da uréia em até 60% do nível normal a partir de amônia e ornitina em fígado de ratos (Glasgow & Chase, 1976). Acredita-se que o acúmulo de amônia deve-se à inibição da primeira enzima do ciclo da uréia, a carbamilfosforotransferase mitocondrial, causada pelo acúmulo intramitocondrial do ácido propiônico e da propionil-CoA (Fenton et alii, 2001).

Vários estudos demonstraram redução na produção de energia cerebral e de lipídios, bem como alterações na fosforilação de proteínas cerebrais causadas por metabólitos acumulados na acidemia metilmalônica. Foram descritos efeitos importantes *in vivo* e *in vitro* do ácido metilmalônico (MA) sobre o metabolismo neuronal, tais como a diminuição do conteúdo de gangliosídios (NANA/gangliosídios) em cérebro de ratos (Wajner et alli, 1988), da utilização de glicose e de corpos cetônicos por prismas de cérebro de ratos, provavelmente devido à inibição das atividades da succinato desidrogenase e da  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase (Dutra et alli, 1991; Dutra et alli, 1993), bem como uma formação aumentada de lactato e uma redução na produção de CO<sub>2</sub> no cérebro de ratos jovens (Wajner et alli, 1992).

Estudos mais recentes com culturas de células de córtex e estriado de cérebro de ratos embriônicos mostraram que a exposição destas células a 10 mM de metilmalonato por 24 horas causou uma mortalidade neuronal superior a 90%, sendo que as células corticais foram as mais vulneráveis. Um decréscimo na relação ATP/ADP também foi observado após o tratamento das células com MA, que foi atribuído à produção de malonato, um inibidor clássico da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs, a partir de metilmalonato (McLaughlin et alli, 1998).

Outros estudos verificaram que a administração intraestriatal de MA provoca convulsões mediadas pelos receptores glutamatérgicos NMDA, que são prevenidas quando os animais são pré-tratados por antagonistas destes receptores (Mello et alli, 1996) e atenuadas quando os animais são pré-tratados com ácido ascórbico ou  $\alpha$ -tocoferol, o que pode indicar o envolvimento de radicais livres nos episódios convulsivos (Fighera et alli, 1999).

Similarmente ao que ocorre na acidemia propiônica, os níveis séricos e urinários de glicina estão elevados na acidemia metilmalônica devido à inibição da conversão de glicina em serina pela propionil-CoA (Hayasaka et alli, 1982).

A hiperamonemia presente na acidemia metilmalônica também pode ser explicada devido ao acúmulo do ácido propiônico, da propionil-CoA ou dos outros metabólitos acumulados nesta doença. Glasgow e Chase (1976), bem como Coude e colaboradores (1979) verificaram que o ácido propiônico reduz a síntese de uréia a partir de ornitina e amônia em fígado de ratos. Por outro lado, Stewart e Walser (1980), baseados no aumento dos níveis de aspartato e citrulina na urina de ratos tratados com MA, concluíram que este ácido também pode exercer efeito inibitório sobre a arginosuccinato sintase. Foi também sugerido que a deficiência do substrato acetil-CoA ou a inibição competitiva da N-acetilglutamato sintase por propionil-CoA levaria à diminuição da síntese de N-acetilglutamato e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis plasmáticos de amônia (Lehnert et alli, 1994; Bergman et alli, 1996; Fenton et alli, 2001).

### 1.2.7 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da acidemia propionica é feito pelo aumento da concentração do ácido propiônico e de seus metabólitos, 3-OH-propionato, metilcitrato, lactato e propioniglicina, na urina dos pacientes afetados. Estudos da atividade da propionil-CoA carboxilase em leucócitos ou fibroblastos são requeridos para a confirmação do diagnóstico.

A acidemia metilmalônica é diagnosticada fundamentalmente pela presença de altas concentrações de ácido metilmalônico na urina. No sangue dos pacientes afetados as concentrações de MA podem alcançar 2,9 mM, enquanto que em pessoas normais

este ácido é praticamente indetectável. Além das altas concentrações de metilmalonato na urina, os pacientes portadores de acidemia metilmalônica apresentam altas concentrações de ácido propiônico e seus metabólitos. Se forem encontradas quantidades excessivas de metilmalonato na urina, deve-se inicialmente descartar deficiência de cobalamina por dosagem da concentração de cobalamina sérica, já que esta vitamina é cofator da enzima metilmalonil-CoA mutase. Estudos em células cultivadas podem ser realizados para se determinar se o defeito é na metilmalonil-CoA mutase ou no metabolismo da cobalamina.

O tratamento das acidemias propiônica e metilmalônica é feito basicamente através de dieta com restrição proteica (0,5 a 1,5 g/Kg/dia) ou preferencialmente por redução da ingesta dos aminoácidos precursores do propionato (Thomas, 1994). Ataques de cetoacidose devem ser tratados por retirada total de proteínas da dieta e administração parenteral de bicarbonato de sódio, bem como de glicose necessária para evitar o catabolismo. Ataques agudos, particularmente aqueles acompanhados por hiperamonemia podem ser tratados por diálise peritoneal. Nutrição parenteral total tem sido usado em pacientes gravemente doentes. A administração de altas doses (100 mg/Kg) de L-carnitina (Boehmer e Bremer, 1968) e também antibioticoterapia, que elimina a flora intestinal que contribui para a elevação das concentrações plasmáticas de propionato, também podem ser utilizadas no tratamento destas doenças (Thomas , 1994).

### **I.3 Modelos Animais**

O uso de modelos animais que simulem uma patologia no homem facilita o estudo da fisiopatologia de várias doenças, incluindo os erros inatos do metabolismo. Estes modelos permitem abordagens impossíveis de serem realizadas com seres humanos,

além de permitir a separação dos diversos fatores causadores da doença (Lo, 1996). Deve-se entretanto salientar que nenhum modelo animal pode mimetizar completamente uma doença, mas auxilia muito na compreensão de sua fisiopatogenia (Herchkowitz, 1982).

Modelos experimentais crônicos e agudos para o estudo das acidemias propiônica e metilmalônica tem sido descritos. Um modelo agudo para a acidemia metilmalônica foi proposto por Patel e colaboradores (1976), no qual ratos com uma semana de vida recebiam três injeções intraperitoneais de MA, com duas horas de intervalo entre as aplicações. O grupo controle, mantido sob as mesmas condições, recebia injeções de solução salina (NaCl 0,9%). O modelo, embora satisfatório em mimetizar a doença para os fins propostos, causou a morte de 10% dos animais do grupo experimental, provavelmente devido à administração de altas concentrações de ácido metilmalônico.

Outro modelo experimental crônico de acidemia metilmalônica baseado na restrição de vitamina B<sub>12</sub> foi descrito e utilizado por vários pesquisadores (Barnes et alli, 1963; Williamson et alli, 1969; Orlando et alli, 1973). Este modelo, no entanto, foi abandonado, pois causava anemia megaloblástica nos animais, um sintoma ausente nos pacientes com as formas clássicas de acidemia metilmalônica (Orlando et alli, 1973). Um outro modelo crônico para estudo da acidemia metilmalônica foi proposto por Dutra e colaboradores (1991), e consistia na administração de MA através de injeções subcutâneas de MA, duas vezes ao dia, do 5º ao 28º dia de vida, mimetizando os dois principais picos pós-prandiais de MA encontrados nos pacientes com esta acidemia. As concentrações plasmáticas e cerebrais de MA provocadas por este modelo foram de, respectivamente, 2,0-2,5 mM e 0,8-1,0 µmol/g (equivalente a 1 mM).

Em relação à acidemia propiônica, recentemente foi descrito por Brusque e colaboradores (1998 e 1999) um modelo agudo e outro crônico. O modelo agudo

consistia de três injeções de PA, com intervalo de 90 minutos entre cada uma delas, enquanto no modelo crônico duas injeções diárias eram administradas do 5º ao 28º dia de vida dos animais. Em ambos modelos, a administração das substâncias foi subcutânea e os níveis plasmáticos de PA atingiram 2-5 mM, enquanto que as concentrações cerebrais eram da ordem de 1 µmol/g (equivalente a 1 mM).

#### **I.4 Testes Comportamentais**

O uso de tarefas comportamentais para avaliar a neurotoxicidade de uma substância é fundamental, uma vez que, ao verificarmos a performance destes animais nestas tarefas, podemos avaliar o dano funcional. No entanto, convém salientar que uma relação direta entre o grau da lesão cerebral e o déficit cognitivo pode ocorrer, mas não é regra. Extensas lesões podem não causar déficit cognitivo, enquanto que pequenas lesões podem gerar grandes consequências funcionais. Vários fatores podem contribuir para a dissociação entre o tamanho da lesão e o déficit funcional. Entre eles podemos citar a localização do dano cerebral, a habilidade prévia do animal, o tempo decorrido desde que ocorreu a lesão e as diferenças individuais. Tendo em vista todos os fatores citados anteriormente e a plasticidade funcional do SNC, podemos realmente avaliar as consequências funcionais de um dano somente após a realização e análise da performance dos animais em tarefas comportamentais (Olton e Markowska, 1994).

##### **I.4.1 Aprendizado e Memória**

Aprendizado e memória são funções básicas do SNC fundamentais para a adaptação de um organismo ao meio ambiente. O aprendizado pode ser definido como a aquisição de informações através da experiência e a memória como o armazenamento de informações (Izquierdo, 1989). Ao escolhermos uma tarefa para avaliar o

aprendizado e a memória de um animal, devemos levar em consideração o interesse e a capacidade do animal de aprender a tarefa e sua capacidade de executá-la. A tarefa do Labirinto Aquático de Morris é adequada para se avaliar cognição em ratos, uma vez que estes animais são bons nadadores e apresentam uma boa capacidade de localização espacial requerida nesta tarefa. Por outro lado, a água é um meio aversivo para estes animais, que ao serem colocados na mesma procuram escapar. A tarefa do labirinto aquático de Morris é, portanto, adequada para a avaliação da integridade da função hipocampal (Olton e Markowska, 1994; Save e Poucet, 2000).

## **I.5 Radicais livres**

### **I.5.1 Definição**

Radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons não pareados. Radicais livres são produzidos continuamente nas células como subproduto do metabolismo, ou deliberadamente durante alguns processos, como a fagocitose (Halliwell e Gutteridge, 1999). Os radicais livres também são denominados espécies reativas de oxigênio, e este termo abrange os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) onde um elétron não pareado é adicionado ao estado basal do  $O_2$ , os radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) peroxila ( $RO_2^{\bullet}$ ) alcoxila, ( $RO^{\bullet}$ ) e os derivados não radicais potencialmente oxidantes, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) o ozônio ( $O_3$ ) o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e os singletos de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além das espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas do nitrogênio são potencialmente danosas. Entre elas podemos destacar o radical óxido nítrico,  $NO^{\bullet}$  e o peróxido nítrico  $ONOO^-$  (Beckman e Koppenol, 1996). Uma vez formados, estes compostos geram uma

reação de oxidação em cadeia que tem como resultado a destruição, modificação ou inativação de um grande número de moléculas.

A geração de radicais livres é uma consequência natural da vida em um ambiente oxidante. As células geram pequenas quantidades de radicais livres enquanto realizam suas funções metabólicas normais. Assim os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio são liberados da mitocôndria durante a síntese de ATP e da hemoglobina durante o transporte de oxigênio (Thomas, 2000).

### 1.5.2 Efeitos fisiológicos dos radicais livres

Apesar dos efeitos deletérios provocados pelos radicais livres, uma pequena quantidade destes é necessária para a realização de funções vitais da célula, como defesa contra organismos invasores, síntese de moléculas essenciais e sinalização celular. Uma oxidase NADPH-dependente carregada por células brancas do sangue gera radical superóxido para ajudar estas células a matar bactérias e fungos. O sistema da mieloperoxidase, que gera ácido hipocloroso (HOCl), é o sistema citotóxico e antibacteriano mais potente dos leucócitos humanos (Bergendi et alli., 1999). Pelo menos 130 genes ou proteínas têm sua atividade modulada por radicais livres. Dentre eles podemos citar várias enzimas como a lipoxigenase, cicloxigenase, tirosina hidroxilase, óxido nítrico sintase e ribonucleosídeo redutase (Thomas, 2000), fatores de transcrição, como c-jun e c-fos, proteínas quinases, como a PKC, MAP quinases e PKB e receptores, como os de insulina (Allen e Tresini, 2000). As enzimas que utilizam radicais livres como modulador realizam um número limitado de ciclos antes da matriz protéica ser danificada pelos mesmos radicais livres necessários ao seu funcionamento. As espécies radicais geradas após a destruição destas enzimas pode iniciar oxidação em

outras partes da célula (Thomas, 2000). A tabela I.4 demonstra alguns efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).

Tabela I.4. Efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO<sup>•</sup>)

Efeitos fisiológicos	Efeitos nocivos
<p><b>Sistema Nervoso</b></p> <p>Resposta a aminoácidos excitatórios (glutamato), neurotransmissão, neuromodulação e plasticidade sináptica</p>	<p>Epilepsia, excitotoxicidade (implicado em muitas doenças neurodegenerativas)</p>
<p><b>Sistema vascular</b></p> <p>Controle da pressão arterial, inibição da agregação de plaquetas, morte de organismos invasores</p>	<p>Choque séptico, inflamação crônica (artrite reumatóide, colite ulcerativa), aumento de risco de câncer e rejeição de transplantes</p>
<p><b>Outros</b></p> <p>Vasodilatação pulmonar, ereção peniana, peristaltismo e controle da bexiga</p>	<p>Asma brônquica</p>

Referência Halliwell e Guterridge, 1999.

### I.5.3 Envolvimento de radicais livres em doenças neurodegenerativas

O cérebro é especialmente sensível ao estresse oxidativo, e dentre as razões para tal vulnerabilidade podemos citar os encontrados na tabela I.5.

Tabela I.5. Motivos que tornam o cérebro especialmente vulnerável ao estresse oxidativo

<ul style="list-style-type: none"><li>❖ alto transporte de <math>\text{Ca}^{++}</math> através de membranas neuronais; qualquer alteração neste fluxo pode gerar estresse oxidativo</li><li>❖ presença de aminoácidos excitotóxicos, que podem gerar estresse oxidativo</li><li>❖ alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido</li><li>❖ muitos neurotransmissores são moléculas autooxidáveis</li><li>❖ várias áreas do cérebro contêm altas concentrações de ferro (por exemplo a substância nigra, o núcleo caudado, o putamen e o <i>globus palidus</i>)</li><li>❖ ao contrário do plasma, o líquido não possui significativa capacidade de ligação a ferro livre</li><li>❖ as membranas lipídicas neuronais contêm alta quantidade de ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada</li><li>❖ o metabolismo cerebral normal gera peróxido de hidrogênio; um exemplo disso é a oxidação da dopamina pela monoaminaoxidase (MAO)</li><li>❖ o cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes</li><li>❖ algumas células gliais (microglia), como os macrófagos, podem produzir <math>\text{O}_2^{\bullet-}</math> e <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> quando ativados</li></ul>
---

Fonte : Halliwell e Gutteridge, 1999.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido focada na injúria provocada por radicais livres como mediador de dano tecidual em doenças humanas. O estresse oxidativo tem sido demonstrado estar relacionado com mecanismos fisiopatológicos de dano cerebral em várias doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Parkinson, de Alzheimer e de Huntington ((Delanty e Dichter,1998; Halliwell, 1994; Matés et alli., 1999; Alexi et alli., 2000; Halliwell e Gutteridge, 1999). Recentemente em nosso

laboratório, foi demonstrado que os ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MA) induzem a geração de radicais livres em córtex cerebral de ratos *in vitro* (Fontella et alli., 2000). Estimulação *in vitro* de superóxido por PA foi também observada em células sanguíneas (Nakao et alli., 1998). Além disso, um estudo realizado por Moyano e colaboradores demonstrou que o estresse oxidativo pode estar envolvido com a fisiopatogenia da acidemia propiônica, uma vez que os níveis de  $\alpha$ -tocoferol estavam muito diminuídos em um paciente com acidemia propiônica (Moyano et alli., 1997).

## **I.6 Agentes Antioxidantes**

### **I.6.1 Definição**

Do ponto de vista biológico, um antioxidante é um composto que em baixas concentrações, em relação ao substrato oxidável, reage com os radicais livres e forma um substrato estável, impedindo a propagação da reação em cadeia ( Bergendi et alli., 1999). Uma definição mais próxima da realidade é que antioxidantes são elementos ou processos que retardam a oxidação por radicais livres *in vivo*. O termo antioxidante inclui todos os processos que tornam mais lenta ou interrompem a oxidação por radicais livres, e nestes estão incluídos:

- I. Os sequestradores de radicais livres que previnem sua propagação
- II. Hidrólise enzimática de esteres para remover ácidos graxos peroxidados
- III. Sequestro de íons de metais de transição
- IV. Redução enzimática de peróxidos

O processo I define como o antioxidante age, enquanto os outros três processos não interrompem a reação dos radicais livres, apenas previnem o acúmulo de moléculas que podem promover a reação dos radicais livres (Thomas, 2000). Os antioxidantes

podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os não enzimáticos destacam-se o ácido ascórbico, a glutathione (GSH), o  $\alpha$ -tocoferol e os carotenóides, como o  $\beta$ -caroteno e o licopeno (Sies e Stahl, 1995). A tabela I.6 mostra alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos encontrados no plasma humano. Entre os antioxidantes enzimáticos, temos a Cu-Zn-superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD), a Mn-SOD, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione redutase (Cassarino e Bennett Jr., 1999).

Tabela 6. Antioxidantes não enzimáticos encontrados no plasma humano

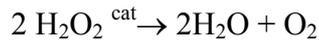
<b>Antioxidante</b>	<b>Concentração no plasma <math>\mu\text{mol/L}</math></b>
<i>Hidrossolúveis</i>	
Ácido ascórbico	30-150
Glutathione (GSH)	1-2
Ácido úrico	160-450
Bilirrubina	5-20
<i>Lipossolúveis</i>	
$\alpha$ -tocoferol	15-40
$\delta$ -tocoferol	3-5
$\alpha$ -caroteno	0,05-0,1
$\beta$ -caroteno	0,3-0,6
Licopeno	0,5-1,0
Luteína	0,1-0,3
Ubiquinol-10	0,4-1,0

Fonte: Sies e Stahl, 1995

## I.6.2 Enzimas Antioxidantes

### I.6.2.1 Catalase (cat)

Converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio:



O cérebro, o coração e o músculo esquelético contêm níveis mais baixos de catalase do que o fígado.

### I.6.2.2 Glutationa Peroxidase (GSHPx)

A glutaciona peroxidase remove o  $\text{H}_2\text{O}_2$  acoplado a sua redução à água com oxidação da glutaciona reduzida.

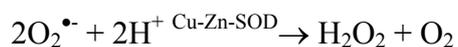


No cérebro a atividade da GSHPx é, relativamente ao fígado, mais alta do que a da catalase.

### I.6.2.3 Superóxido dismutase (SOD)

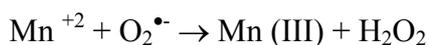
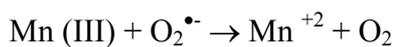
#### 6.2.3.1. Cu-Zn-SOD

Está localizada no citosol, lisossomas, núcleo e peroxissomas. Catalisa a reação:



#### 6.2.3.2. Mn-SOD

Está localizada na mitocôndria. Catalisa a reação:



Fonte: Halliwell e Gutteridge, 1999.

#### 1.6.3 Ácido Ascórbico

As plantas e a maioria dos animais podem sintetizar ácido ascórbico a partir de glicose (figura I.3), porém, na escala evolucionária, os primatas, o porquinho-da-índia e o morcego das frutas perderam esta capacidade (Halliwell e Gutteridge, 1999). Nestes animais, a enzima gulanolactona oxidase, enzima requerida para o passo final da síntese do ascorbato, está inativa. Paradoxalmente, tendo em vista que a reação de produção de ascorbato gera peróxido de hidrogênio, síntese aumentada de ascorbato pode levar ao estresse oxidativo.

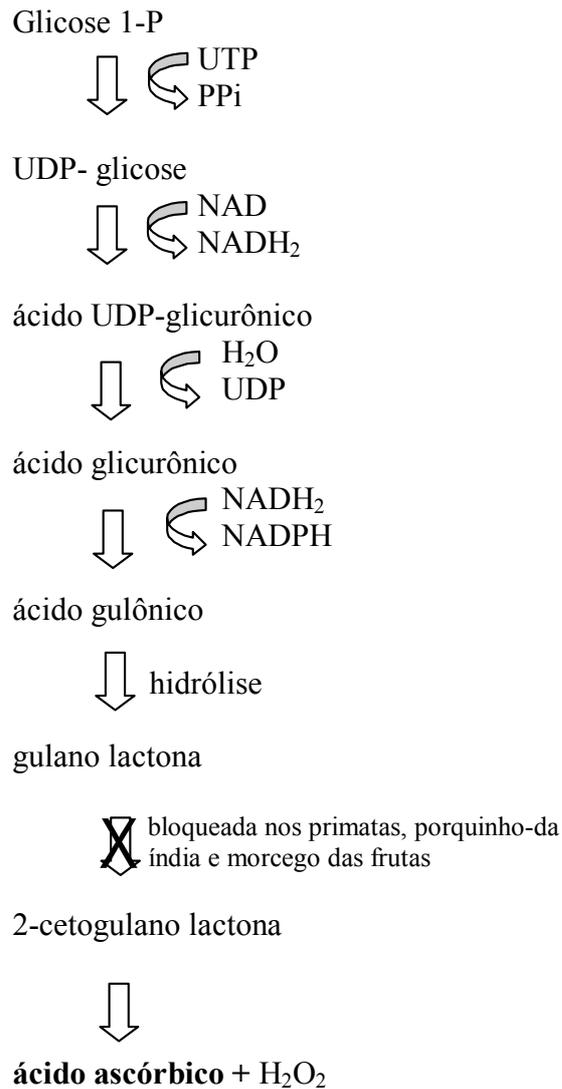


Figura I.3. Síntese de ácido ascórbico a partir de glicose

O ascorbato (vitamina C) é cofator de pelo menos oito enzimas *in vivo*, entre elas a prolina e a lisina hidroxilase, que estão envolvidas na síntese do colágeno. O ácido ascórbico também é requerido para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina.

O ascorbato tem se mostrado um ótimo antioxidante *in vitro*, agindo como sequestrador de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$ , radicais peroxila hidrossolúveis,  $\text{HOCl}$ , peroxinitritos e agentes nitrosantes, singletes de oxigênio, hemo e mioglobina- $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso o

ascorbato regenera o  $\alpha$ -tocoferol, seqüestra radicais nítróximo, protege membranas e lipoproteínas contra a peroxidação lipídica induzida por cigarro, mas não inibe a formação de proteína carbonila em plasma humano, um sequestrador de  $O_3$  e  $NO_2^\bullet$  em líquidos biológicos humanos. A vitamina C também apresenta efeitos pró oxidantes, já que *in vitro* ela pode reduzir o ferro ( $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ ). Assim, misturas contendo cobre ou ferro e ascorbato estimulam o dano ao ADN, lipídios e proteínas. Porém, apesar disso, não existem evidências convincentes para indicar com segurança que há toxicidade de altas doses de ascorbato em seres humanos saudáveis (Halliwell e Gutteridge, 1999; Diplock, 1995) . Sabemos, no entanto, que doses de 200 mg/dia de ascorbato são suficientes para saturar células e líquidos biológicos humanos com ascorbato. Qualquer excesso de ácido ascórbico é excretado. Por outro lado, fumantes “pesados” necessitam de doses mais elevadas desta vitamina.

É interessante notar que os efeitos pró-oxidantes *in vitro* não se restringem somente ao ácido ascórbico. Vários outros antioxidantes, como a vitamina E e a glutathiona (GSH) também apresentam esta propriedade na presença de metais de transição. A chave da questão *in vivo*, portanto, é a disponibilidade dos metais de transição (Halliwell e Gutteridge, 1999).

#### 1.6.4 Defesas antioxidantes no cérebro

Todas as regiões cerebrais contém CuZnSOD, MnSOD, GSHPx e GSH. Em ratos e possivelmente em outros animais, os níveis neuronais de GSH são menores do que o das células gliais, fazendo com que estas células sejam menos suscetíveis ao estresse oxidativo do que os neurônios. A concentração de ascorbato no cérebro é alta, sendo que a concentração no líquido é mais alta do que a do plasma. As células gliais e os neurônios apresentam um sistema de transporte ativo que concentra o ascorbato

intracelular, que se encontra em níveis de milimolar. Na ausência de íons de metais de transição, o ascorbato apresenta propriedades antioxidantes bem estabelecidas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

## II OBJETIVOS

---

1. Investigar o efeito da administração crônica de propionato e metilmalonato sobre o comportamento de ratos na tarefa do labirinto aquático de Morris.
2. Verificar se o ácido ascórbico (vitamina C) altera ou interfere nos efeitos provocados pelos ácidos propiônico e metilmalônico.
3. Avaliar o potencial antioxidante total, bem como a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) no hipocampo dos animais tratados cronicamente com os ácidos propiônico e metilmalônico.

### III MATERIAL E MÉTODOS

---

#### III.1 Animais:

Após o acasalamento, as ratas grávidas foram colocadas em caixas individuais e aí mantidas durante toda a gestação. Quarenta e oito horas após o nascimento, foram escolhidos oito filhotes machos por matriz e mantidos junto com uma rata mãe. Para as tarefas comportamentais e avaliação do potencial antioxidante total (TRAP) os animais foram divididos em seis grupos de forma que cada caixa apresentava pelo menos um rato para cada tratamento: I) salina, II) propionato, III) metilmalonato, IV) ascorbato, V) propionato com ascorbato e VI) metilmalonato com ascorbato. Para os ensaios enzimáticos os ratos foram divididos em três grupos: I) salina, II) propionato e III) metilmalonato. Os filhotes foram desmamados aos 21 dias, e após o desmame todos tiveram livre acesso à água e à ração comercial. Todos os animais foram mantidos em ambiente climatizado ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e com ciclo de claro/escuro de 12 horas.

#### III.2 Tratamento:

Foi administrado subcutaneamente propionato (PA) (grupo II) ou metilmalonato (MA) (grupo III) dissolvidos em solução salina com pH ajustado para 7,4, duas vezes ao dia, do 5º ao 28º dia de vida, para reproduzir os modelos experimentais químicos das acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente (Brusque et alii, 1998; Dutra et alii, 1991) (tabela III.1). As doses de propionato administradas foram calculadas para atingir as concentrações plasmáticas de 1 a 5 mM, da seguinte forma: 5º-12º dia de vida,  $0,72 \mu\text{mol/g}$  de peso corporal; 13º-19º dia de vida,  $1,68 \mu\text{mol/g}$  de peso corporal; 20º-

28º dia de vida, 1,92 µmol/g de peso corporal (Brusque et alli., 1998). As doses de metilmalonato foram calculadas para atingir as concentrações plasmáticas de 2,0 a 2,5 mM, da seguinte forma: 5º-12º dia de vida, 0,72► mol/g peso corporal; 13º-17º dia de vida, 0,89► mol/g peso corporal; 18º-28º dia de vida 1,67► mol/g peso corporal (Dutra et alli, 1991). Os animais também foram tratados com vitamina C isoladamente, dissolvida em solução salina, pH 7,4, (grupo IV) ou associada a um dos ácidos acima (grupos V e VI), também dissolvidas em solução salina, pH 7,4. A dose de vitamina C administrada duas vezes ao dia foi de 100 mg/Kg de peso corporal por dia. Todas as soluções foram preparadas de forma que cada animal de todos os grupos recebesse 10► L de solução por grama de peso corporal. Os ratos controles foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%) nos mesmos volumes (grupo I).

Tabela III.1. Doses de ácido propiônico e metilmalônico administrado aos ratos durante o tratamento crônico de acordo com a idade.

Idade \ Grupo		
5º - 12º dia		
	1,68 µmol/g	0,89 µmol/g
20º - 28º dia	19,2 µmol/g	1,67 µmol/g

### III.3 Tarefas cognitivas

As tarefas cognitivas foram realizadas de acordo com o cronograma apresentado na tabela III.2.

Tabela III.2. Cronograma das tarefas cognitivas

5°-28° dia	29°-59° dia	60°-64° dia	65° dia	66°-80° dia	81°-84° dia	85° dia	86°-100° dia	101°-102° dia
Tratamento	Espera	aquisição/ treino	Aquisição/ teste	Espera	fase reversa treino	fase reversa teste	espera	campo aberto

### III.3.1 Labirinto Aquático de Morris (water maze)

Após o tratamento, os animais foram divididos de forma que ficaram 4 ratos por caixa (sempre com o cuidado de ter um controle por caixa). Do ultimo dia de tratamento até o início das tarefas os animais não sofreram nenhum outro tipo de tratamento. No 60° dia de vida, a memória espacial dos animais foi testada no labirinto aquático de Morris (Morris et alli., 1982; Netto et alli., 1993), que consiste de uma piscina circular de cor preta (200 cm de diâmetro, 100 cm altura), preenchida com 50 cm de água a  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Esta piscina foi dividida por uma linha imaginária em 4 quadrantes para posterior análise dos resultados. O experimentador permaneceu na mesma posição durante toda a sessão de treino a aproximadamente 50 cm da borda da piscina. Uma câmera de vídeo foi montada sobre o centro do tanque e os animais foram filmados.

#### III.3.1.1 Fase de aquisição (treino)

Os ratos receberam sessões diárias de treino, consistindo de 4 treinos por dia durante 5 dias consecutivos para encontrar a plataforma submersa no centro do quadrante 1 do tanque, conforme demonstra a figura III.1. A plataforma permaneceu na mesma posição durante toda a fase de aquisição. Todos os animais de todos os grupos foram capazes de nadar durante os treinos, caso contrário eram descartados do

experimento. Em cada treino o rato era colocado delicadamente na água, com o focinho virado para a borda do tanque, aleatoriamente em uma das quatro posições de largada (N, S, L e O), conforme mostra a figura III.1. A ordem de largada variou em uma seqüência aleatória, de forma que o mesmo rato não largasse duas vezes da mesma posição no mesmo dia, e tal seqüência não foi repetida em dias consecutivos. Após ser colocado na água, foi permitido a cada rato nadar livremente na piscina para procurar a plataforma durante 60 segundos. Uma vez localizada a plataforma, foi permitido ao rato permanecer sobre ela por 10 segundos. Se o animal não encontrasse a plataforma durante os 60 segundos, ele era guiado pelo experimentador, e permanecia sobre a plataforma também por 10 segundos. Depois de cada treino, cada rato era removido da plataforma, seco com uma toalha e devolvido à sua caixa original. O intervalo entre cada treino era de 15-20 minutos (Warren and Juraska, 2000).

#### III.3.1.2 Fase de aquisição (teste):

Um dia após o último treino (6<sup>o</sup>) dia, a plataforma era removida, e cada rato era submetido a um teste de 60 segundos. O rato era colocado na água nas mesmas condições do teste, porém a plataforma não estava presente, fazendo com que o rato permanecesse por 60 segundos procurando a mesma. O tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava localizada originalmente foi tomado como medida de memória espacial.

#### III.3.1.3 Fase reversa: treino reverso

Duas semanas após o teste, os ratos eram submetidos ao aprendizado reverso, similar à fase de aquisição, porém com a plataforma localizada no quadrante diagonalmente oposto ao treino anterior (figura III.1, quadrante 3), permanecendo na mesma posição durante toda esta fase de treinos. Os treinos da fase reversa duraram 4

dias e consistiam, como na fase de aquisição, de blocos de 4 treino por dia, com posições de largada variando aleatoriamente.

#### III.3.1.4 Fase reversa: teste reverso

No quinto dia, um dia após o último treino da fase reversa, os ratos eram submetidos a um segundo teste. Cada rato era colocado na piscina sem a plataforma e lhe era permitido nadar por 60 segundos. O tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava localizada no treino reverso foi medido (Block and Schwarz, 1998).

#### III.3.2 Tarefa do Campo Aberto

Quinze dias após o teste da fase reversa, os ratos foram submetidos à tarefa do campo aberto. O aparelho consistia de uma caixa de madeira, medindo 60 X 40 X 50 cm com um vidro transparente na parede da frente, e cujo chão foi dividido em 12 quadrados (figura III.2). Os ratos eram colocados delicadamente na caixa, com o focinho virado para o canto da caixa, e o número de cruzamentos (número de vezes que os ratos passavam com as quatro patas de um quadrado para o outro) foi medido para avaliar a atividade motora dos animais (Walsh and Cummins, 1976).

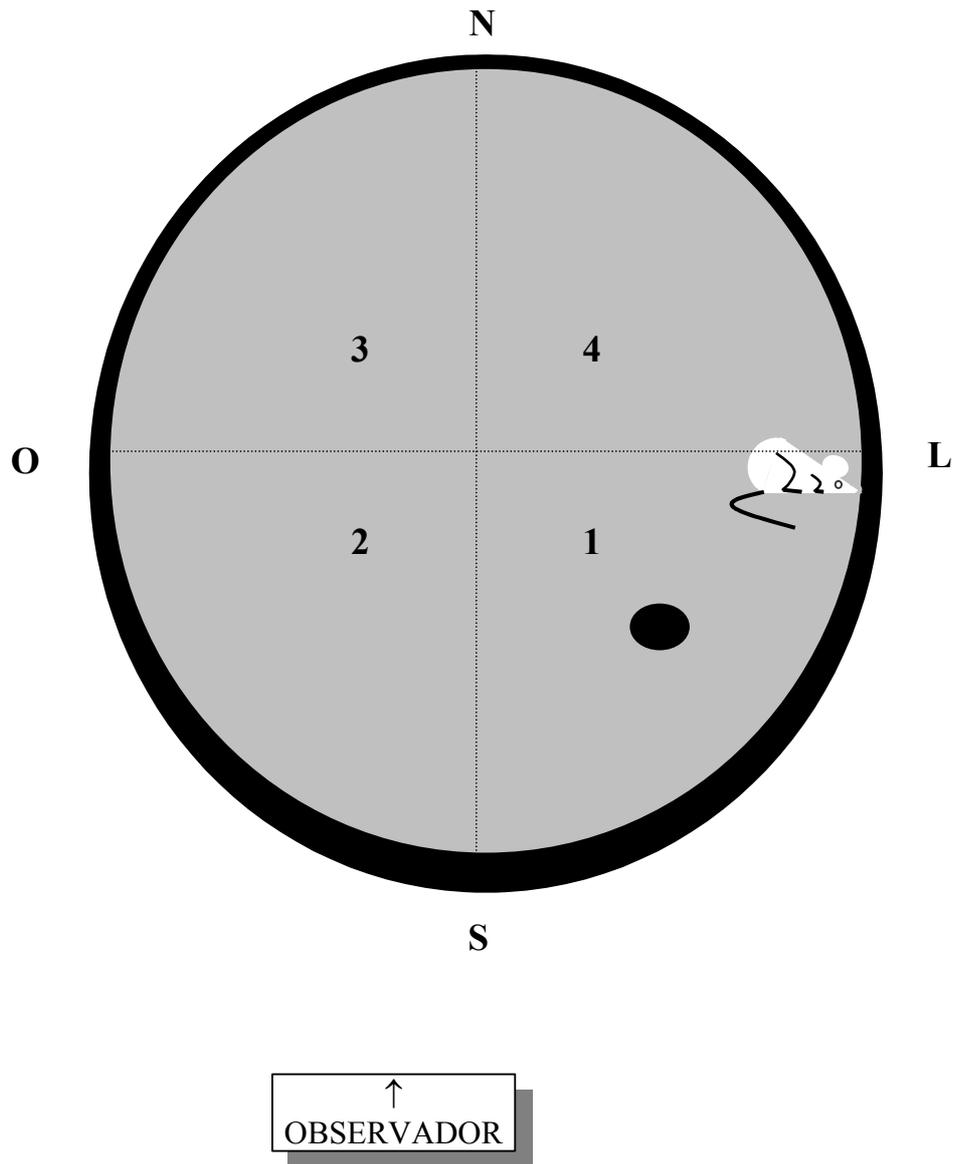


Figura III.1. Labirinto aquático de Morris.

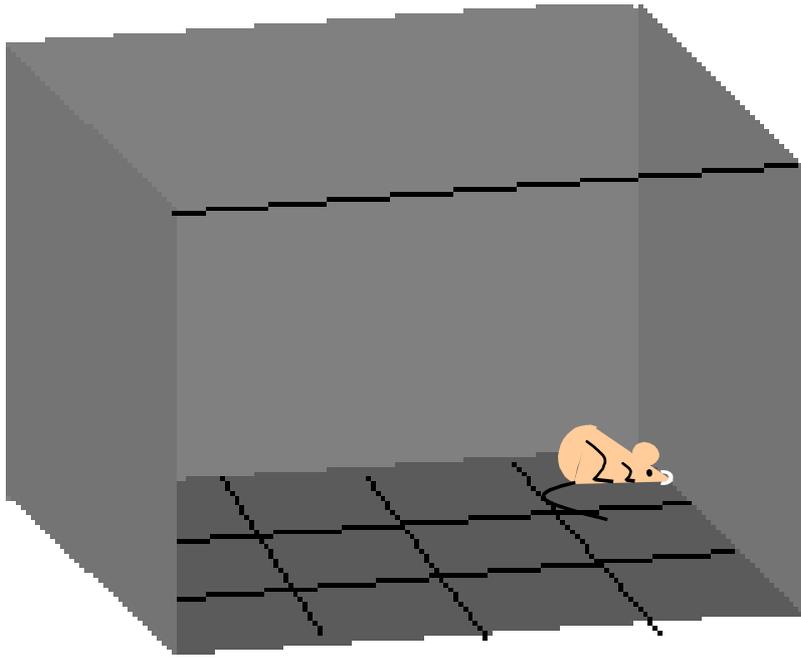


Figura III.2. Campo aberto.

### **III.4 Ensaios bioquímicos**

#### III.4.1 Tampões

##### III.4.1.1 Fosfato de sódio com KCl, pH 7,4

2,17g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,260g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

5,22g de KCl

Preparo em água MiliQ

Volume final: 500mL, pH 7,4.

##### III.4.1.2 Glicina, pH 8,6

3,75g de glicina

Preparo em água MiliQ

Volume final: 500 mL, pH 8,6.

##### III.4.1.3 Tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0

I. 1,36g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Preparo em água MiliQ

Volume final: 500 mL

II. 1,74g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Preparo em água MiliQ

Volume final: 500 mL

Adicionar I em II até atingir o pH 7,0. Medir o volume e adicionar igual volume de água MiliQ.

Volume final: aproximadamente 2000 mL, pH 7,0.

#### III.4.1.4 Tampão fosfato de potássio com EDTA 100mM, pH 7,7

I. 3,4g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Preparo em água MiliQ

Volume final: 125 mL

II. 4,35g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Preparo em água MiliQ

Volume final: 125 mL

Adicionar I em II até atingir o pH 7,7. Medir o volume e adicionar igual volume de água MiliQ.

Volume final: aproximadamente 500 mL, pH 7,7.

Adicionar 0,3722g de EDTA por litro de tampão pronto.

#### III.4.2 Preparo da amostra

Para os ensaios bioquímicos, os animais foram decapitados sem anestesia no 29º dia de vida (18 horas após a última injeção). O cérebro foi rapidamente removido e dissecado sobre gelo para a obtenção do hipocampo, de onde todo sangue visível foi removido com auxílio de um papel de filtro. O hipocampo foi imediatamente pesado e

homogeneizado 1:10 (m/v) em tampão fosfato de potássio com KCl, pH 7,4. Após a homogeneização, as amostras foram aliqüotadas e imediatamente congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , sendo descongeladas apenas no dia dos ensaios.

#### III.4.3 Potencial antioxidante total do tecido (TRAP)

O TRAP representa a capacidade antioxidante total do tecido e foi determinada medindo a intensidade de quimiluminescência do luminol induzida por 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP) a temperatura ambiente. Para o preparo das soluções de ABAP (10mM), de luminol (4mM) e de trolox (padrão, 80 $\mu\text{M}$ ), foi utilizado tampão glicina, pH 8,6. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos; após este tempo era adicionado 4 mL de solução de ABAP e contado a luminescência basal (6 contagens de 20 segundos cada). Depois das contagens basais era adicionado luminol ao tubo e imediatamente medida a luminescência (6 contagens de 20 segundos), que é o nível de luminescência que será atingida após esgotarem-se os antioxidantes da amostra (10 $\mu\text{L}$  do homogeneizado de hipocampo) que será colocada em seguida. Após a adição da amostra, os tubos eram contados até que as contagens atingissem um valor próximo do encontrado para o ABAP+luminol. As contagens eram posteriormente colocadas em um gráfico para a determinação do tempo de indução, que é o tempo que os antioxidantes presentes na amostra impediram a quebra do anel de luminol pelo agente oxidante ABAP. O procedimento utilizado para as amostras foi repetido para o trolox. Após a determinação da luminescência da mistura ABAP+luminol, foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  de trolox 80 $\mu\text{M}$ . O tempo de indução do trolox serve como padrão. Os resultados são expressos como nmol de trolox por mg de proteína (Lissi et alii, 1992).

### III.4.4 Enzimas

Para os ensaios enzimáticos as amostras foram centrifugadas a 1000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para posterior utilização e o sedimento descartado.

#### III.4.4.1 Glutationa peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi medida pelo método de Wendel (1981), exceto pela concentração de NADPH que foi ajustada para 0,1 mM depois de testes prévios realizados em nosso laboratório. O hidroperóxido de tert-butil foi utilizado como substrato. O desaparecimento do NADPH foi monitorado espectrofotometricamente a 340 nm.

O meio de reação contendo tampão, azida sódica (0,4 mM), glutaciona (2 mM), glutaciona redutase (1,87 U/mL), amostra (1 parte do sobrenadante para 10 partes do meio) e NADPH (0,1 mM), foi lido por 100 s com intervalos de 10 s entre as leituras a 340 nm a 25°C. Após este período, foi adicionado tert-butil e lido por mais 200 s, nas mesmas condições. Uma unidade de GSH-Px é definida como um  $\mu$ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica representada como unidades por mg de proteína.

#### III.4.4.2 Superóxido dismutase (SOD)

O ensaio da SOD foi feito utilizando-se um kit RANSOD (Randox, USA). Este método é baseado na formação do formazan vermelho a partir da reação do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólico e o radical superóxido (produzido no meio de incubação pela reação da xantina oxidase). A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra.

O kit foi preparado conforme instruções do fabricante e a amostra conforme descrito acima. O ensaio foi realizado a 37°C e a formação do composto corado foi determinada espectrofotometricamente a 505 nm. Uma unidade de SOD é definida como 50% de inibição da formação do cromógeno e a atividade específica é definida como unidades por mg de proteína.

#### III.4.4.3 Catalase

A atividade da catalase foi medida pelo método de Aebi (1984) que é baseado no desaparecimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm.

Para o ensaio da catalase foram tomados 150 µL de sobrenadante, e a este foram adicionados 15 µL de etanol 10%. A mistura permaneceu em gelo por 30 minutos. Após foi adicionado 15 µL de triton X 100 a 10%. O meio de reação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) foi preparado em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0. A amostra era então adicionada ao meio de reação. Mediu-se espectrofotometricamente a 240 nm o desaparecimento da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio de reação a 25°C. Uma unidade de catalase é definida como um µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e a atividade específica é definida como unidade por mg de proteína.

#### III.4.5 Proteínas:

Todos os resultados dos ensaios bioquímicos foram expressos em mg de proteínas, que foram quantificadas pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina sérica bovina com padrão.

### **III.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos no labirinto aquático de Morris (water maze) foram analisados por análise de variância (ANOVA). Quando necessário, era realizado como teste *post hoc* o teste de Duncan. Os dados da tarefa do campo aberto foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis por não apresentarem distribuição normal. Todos os ensaios bioquímicos foram analisados por análise de variância (ANOVA), e quando necessária a utilização de um teste *post hoc*, recorreremos ao teste de Duncan. Para todos os experimentos, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## IV RESULTADOS

---

O peso corporal dos ratos submetidos ao tratamento crônico com propionato (PA) e metilmalonato (MA) não foi diferente do peso dos controles ou dos ratos que receberam ácido ascórbico (AA) (tabela IV.1), indicando que nenhum dos tratamentos administrados causou malnutrição.

### IV.1 Tarefas cognitivas

#### IV.1.1 Labirinto aquático de Morris- fase de aquisição (treino)

A figura IV.1 mostra que todos os grupos de animais (controle, PA, AA e PA+AA) melhoraram o seu desempenho no labirinto aquático de Morris, isto é diminuíram sua latência para encontrar a plataforma do primeiro até o último dia de treino (dia 5) ( $F(3,43) = 903.3, p < 0.05$ ). Entretanto, a comparação entre os grupos revelou que os animais tratados com propionato encontraram a plataforma com latências maiores do que os outros grupos ao longo do treino ( $F(3,43) = 4.65, p < 0.05$ ), isto é a velocidade de aquisição ao longo do tempo foi menor para os animais tratados com propionato do que para os demais grupos. Por outro lado, apesar de observarmos que não houve diferenças significativas entre os controles e os animais tratados com ácido ascórbico, houve uma tendência de que os ratos tratados com AA gastem menos tempo para encontrar a plataforma durante o treino.

A figura IV.2 mostra que todos os grupos de animais (controle, MA, AA e MA+AA) melhoraram o seu desempenho no labirinto aquático de Morris ao longo do tempo, isto é diminuíram sua latência para encontrar a plataforma do primeiro até o último dia de treino (dia 5) ( $F(3,43) = 529,7, p < 0.05$ ). A comparação entre os grupos

também revelou a mesma velocidade de aquisição para os grupos ao longo do tempo ( $F(3,43)= 1,30, p= 0,288$ ). Por outro lado, também observamos que não houve diferenças significativas entre os controles e os animais tratados com ácido ascórbico, embora houvesse uma tendência de que os ratos tratados com AA gastassem menos tempo para encontrar a plataforma durante os treinos.

#### IV.1.2 Labirinto aquático de Morris - fase de aquisição (teste):

No teste (sem a plataforma) o grupo tratado com propionato não lembrou a posição precisa da plataforma, gastando significativamente menos tempo no quadrante onde a plataforma estava localizada durante os treinos (quadrante alvo) do que os demais grupos, incluindo PA+AA ( $F(3,43)=4.319, p < 0.05$ ) (Figura IV.3).

O grupo tratado com MA, no teste (sem a plataforma) apresentou o mesmo desempenho que os demais grupos (controle, AA, MA+AA) ( $F(3,43)=1,561, p = 0,214$ ) (Figura IV.4).

#### IV.1.3 Labirinto aquático de Morris - fase reversa (treino reverso):

A figura IV.5 mostra que todos os grupos de ratos, incluindo os tratados com propionato, aprenderam a tarefa, isto é, diminuíram sua latência para encontrar a plataforma do primeiro até o último dia de treino (dia 4) ( $F(3,43)=249,9, p < 0,05$ ). A comparação entre os grupos revelou que todos apresentaram a mesma velocidade de aquisição na fase reversa (treino reverso) ( $F(3,43)=0,676, p = 0,572$ ), refletindo que neste segundo treino eles já haviam aprendido a estratégia da tarefa.

A figura IV.6 mostra que todos os grupos de ratos, incluindo os tratados com MA, aprenderam a tarefa, isto é, diminuíram sua latência para encontrar a plataforma do primeiro até o último dia de treino (dia 4) ( $F(3,43)= 371,2, p < 0,05$ ). A comparação

entre os grupos revelou que todos apresentaram a mesma velocidade de aquisição na fase reversa (treino reverso) ( $F(3,43)=1,561, p = 0,214$ ).

#### IV.1.4 Labirinto aquático de Morris - fase reversa (teste reverso):

Apesar dos animais terem apresentado a mesma performance no treino reverso, o mesmo não se repetiu no teste reverso, onde os animais tratados com propionato permaneceram significativamente ( $F(3,43)= 4,09, p<0,05$ ) menos tempo no quadrante alvo do que os demais grupos (figura IV.7). Estes resultados sugerem que os animais tratados com PA não conseguiram lembrar a posição da plataforma. Entretanto a observação de que os ratos recebendo administração de PA+AA apresentaram uma boa retenção indica que o ascorbato preveniu o déficit de memória causado pela administração de PA.

Os animais tratados com MA também gastaram significativamente menos tempo no quadrante alvo durante o teste reverso ( $F(3,43)= 7,353, p<0,05$ ) (figura IV.8). Estes resultados sugerem que os animais tratados com MA não conseguiram lembrar a posição da plataforma no treino reverso, visto que ficaram menos tempo no quadrante alvo quando comparado com os outros grupos. Por outro lado, quando tratados simultaneamente com MA e AA os animais comportaram-se como o grupo controle, indicando que o ascorbato melhorou sua memória.

#### IV.1.5 Campo Aberto:

A análise da atividade motora (número de cruzamentos) dos ratos não mostrou nenhum efeito de qualquer tratamento usado, sugerindo que o déficit para encontrar a plataforma revelado no labirinto aquático de Morris para o grupo tratado com PA não pode ser creditado a um déficit motor (tabela IV.2).

Os grupos tratados com MA e MA+AA também não revelaram nenhum déficit motor no campo aberto (tabela IV.3), indicando que déficit motor não pode explicar o pior desempenho deste grupo de animais no teste da fase reversa na tarefa do labirinto aquático de Morris.

## **IV.2 Ensaio Bioquímicos**

### **IV.2.1 Potencial antioxidante total (TRAP)**

A figura IV.9 mostra que o potencial antioxidante total (TRAP) do hipocampo dos animais tratados cronicamente com PA e MA é significativamente menor do que o dos controles ( $F(5,53) = 3,558, p < 0.05$ ), indicando que os tratamentos com PA e MA diminuem a quantidade de um ou mais antioxidantes. Esta figura também mostra que os demais grupos (AA, PA+AA e MA+AA) não foram diferentes dos controles. O tratamento com vitamina C não aumentou o potencial antioxidante total, em relação ao controle. Por outro lado, a injeção crônica de ácido ascórbico associada ao propionato ou ao metilmalonato preveniu a redução do TRAP provocada pelos ácidos propiônico e metilmalônico.

### **IV.2.2 Enzimas**

#### **IV.2.2.1 Glutathione peroxidase (GSH-Px)**

Como podemos observar na figura IV.10, nenhum dos tratamentos administrados alterou a atividade de enzima glutathione peroxidase no hipocampo dos ratos, quando comparada com o grupo controle ( $F(5,35) = 1,121, p > 0.05$ ).

#### IV.2.2.2 Superóxido dimutase (SOD)

Na figura IV.11 podemos observar que os nenhum dos tratamentos administrados alterou a atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo dos ratos quando comparada com o grupo controle ( $F(5,35) = 1,559, p > 0.05$ ).

#### IV.2.2.3 Catalase (CAT)

Na figura IV.12 podemos observar que nenhum dos tratamentos administrados alterou a atividade da enzima catalase no hipocampo dos ratos, quando comparada com os controles ( $F(5,35) = 0,692, p > 0.05$ ).

**Tabela IV.1.**

**Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) e ácido metilmalônico + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o peso corporal dos ratos.**

Idade dos animais (dias)					
<b>Grupo</b>	5	10	15	20	28
Controle	11,44 ± 0,412*	19,77 ± 0,572	27,56 ± 0,503	35,44 ± 1,79	67,33 ± 3,05
PA	11,33 ± 0,408	19,77 ± 0,434	27,78 ± 0,682	36,22 ± 1,78	67,78 ± 2,69
MA	11,3 ± 0,396	19,2 ± 0,533	27,31 ± 0,633	35,8 ± 1,16	69,8 ± 1,85
AA	11,36 ± 0,337	19,81 ± 0,536	27,55 ± 0,474	36,27 ± 1,13	70,36 ± 1,77
PA+AA	11,85 ± 0,404	20,57 ± 0,685	28,57 ± 0,922	38,14 ± 1,24	72,86 ± 3,40
MA+AA	11,20 ± 0,326	19,4 ± 0,581	27,6 ± 0,542	36,5 ± 0,792	68,7 ± 1,77

Dados expressos como média ± SEM para 11 ratos em cada grupo. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (análise de variância de 1 via). \* peso em gramas.

**Tabela IV.2**

**Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido ascórbico (AA) e ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) sobre o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto**

<b>Grupo</b>	1º sessão			2º sessão		
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Controle	33,50	31,00	37,00	39,00	30,00	49,00
PA	39,00	34,00	44,50	38,00	34,00	41,00
AA	33,00	27,00	37,00	35,00	34,00	42,00
PA+AA	38,00	26,00	42,00	34,00	29,00	36,00

Dados são expressos como mediana e percentil para 11 ratos em cada grupo. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ( teste de Kruskal-Wallis).

**Tabela IV.3**

**Efeito da administração crônica pós natal de ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA) e ácido metilmalônica + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto**

<b>Grupo</b>	1º sessão			2º sessão		
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Controle	33,50	31,00	37,00	39,00	30,00	49,00
MA	35,00	33,00	39,00	38,50	35,00	41,00
AA	33,00	27,00	37,00	35,00	34,00	42,00
MA+AA	38,50	31,00	41,00	37,00	36,00	48,00

Dados são expressos como mediana e percentil para 11 ratos em cada grupo. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis).

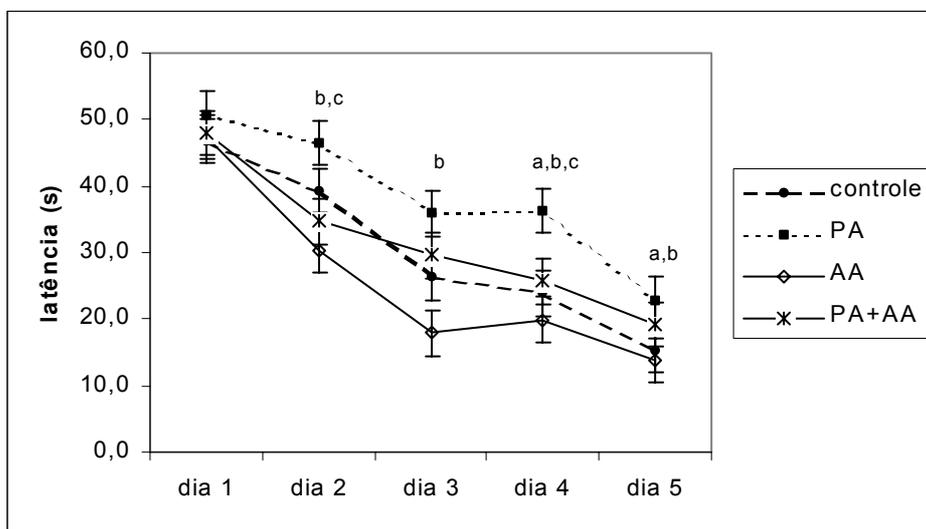


Figura IV.1. Efeito da administração crônica pós natal de PA, AA e PA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase de aquisição), na tarefa do labirinto aquático de Morris. PA= ácido propiônico; AA= ácido ascórbico; PA+AA= ácido propiônico + ácido ascórbico.  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos controles (a), do grupo AA (b), do grupo PA+AA (c). (ANOVA seguida do teste de Duncan),  $n=11$ .

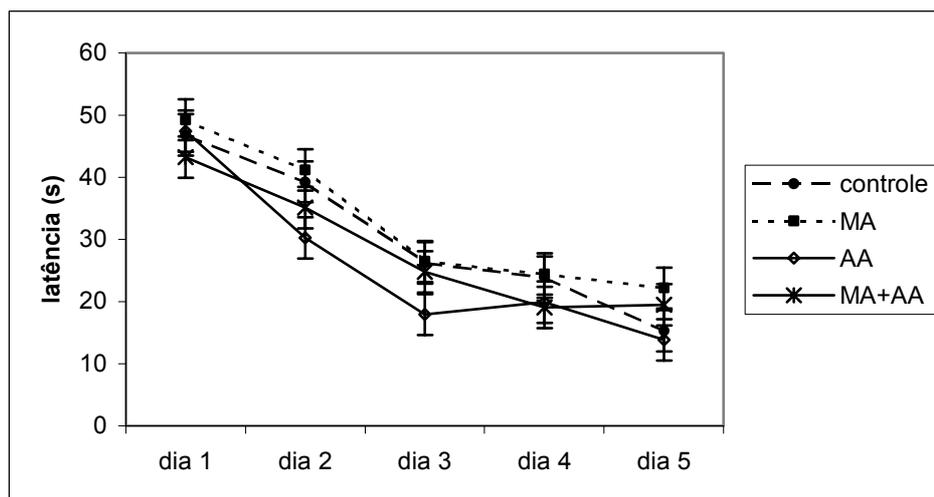


Figura IV.2. Efeito da administração crônica pós natal de MA, AA e MA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase de aquisição), na tarefa do labirinto aquático de Morris. MA= ácido metilmalônico; AA= ácido ascórbico; MA+AA= ácido metilmalônico + ácido ascórbico. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (ANOVA), n=11.

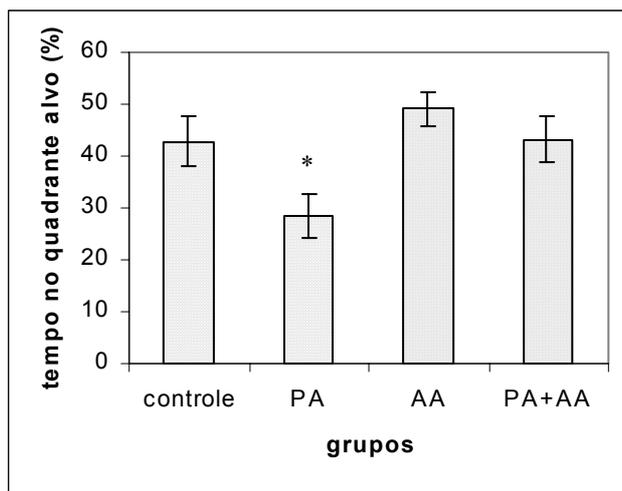


Figura IV.3. Teste da fase de aquisição. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (expresso em porcentagem do tempo total). PA= ácido propiônico; AA= ácido ascórbico; PA+AA= ácido propiônico + ácido ascórbico. Valores expressos como média  $\pm$  SEM . \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Duncan),  $n=11$ .

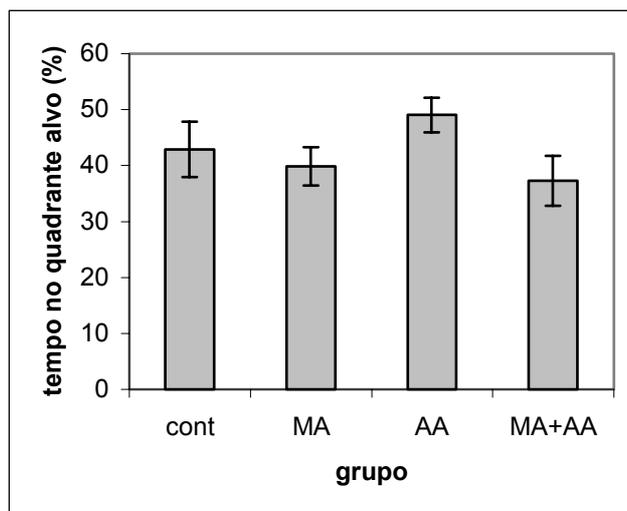


Figura IV.4. Teste da fase de aquisição. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (como porcentagem do tempo total). MA= ácido metilmalônico; AA= ácido ascórbico; MA+AA= ácido metilmalônico +ácido ascórbico. Valores expressos como média  $\pm$  SEM . \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA seguida do teste de Duncan),  $n=11$ .

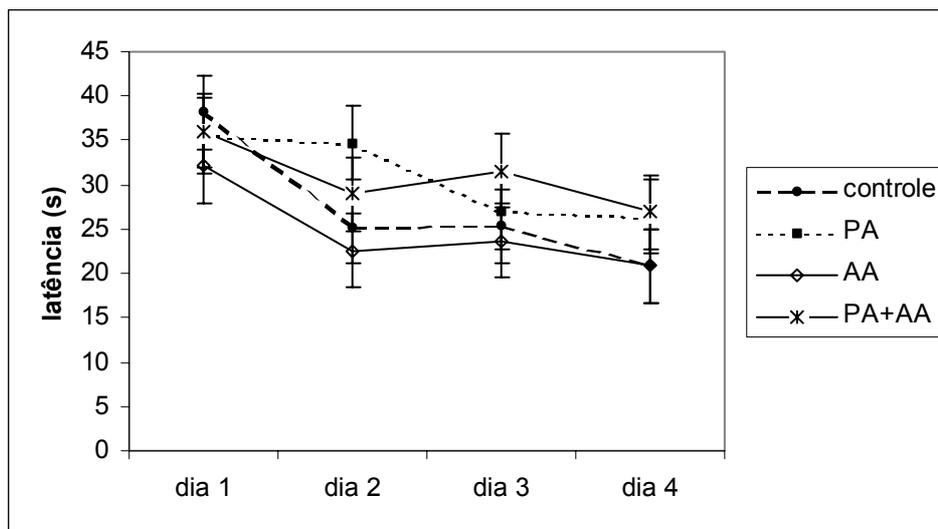


Figura IV.5. Efeito da administração crônica pós natal de PA, AA e PA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase reversa) na tarefa do labirinto aquático de Morris. PA= ácido propiônico; AA= ácido ascorbico; PA+AA= ácido propiônico + ácido ascórbico. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (ANOVA), n=11.

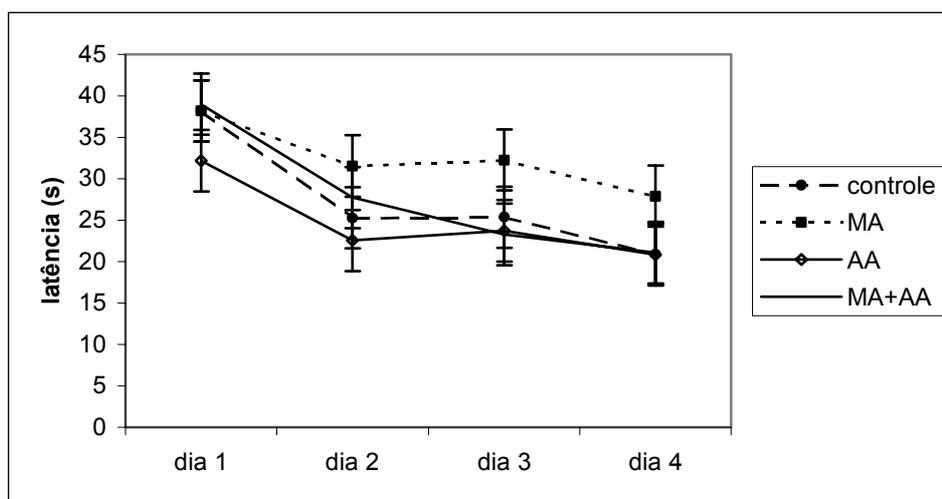


Figura IV.6. Efeito da administração crônica pós natal de MA, AA e MA+AA sobre o comportamento de ratos durante o treino (fase reversa) na tarefa do labirinto aquático de Morris. MA= ácido metilmalônico; AA= ácido ascórbico; MA+AA= ácido metilmalônico +ácido ascórbico. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (ANOVA), n=11.

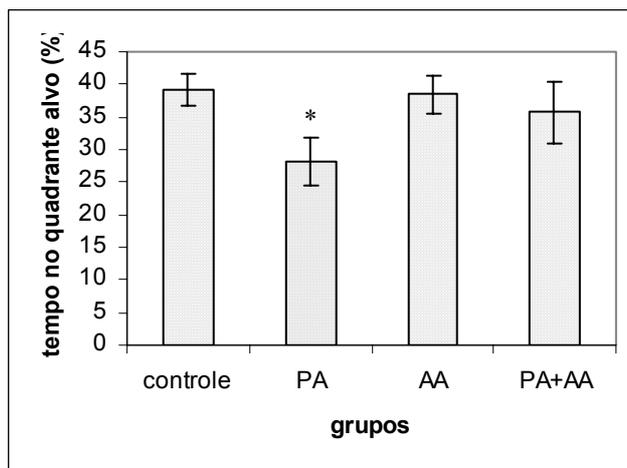


Figura IV.7. Teste da fase reversa. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (expresso como porcentagem do tempo total). PA= ácido propiônico; AA= ácido ascórbico; PA+AA= ácido propiônico + ácido ascórbico. Valores expressos como média  $\pm$  SEM . \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Duncan),  $n=11$ .

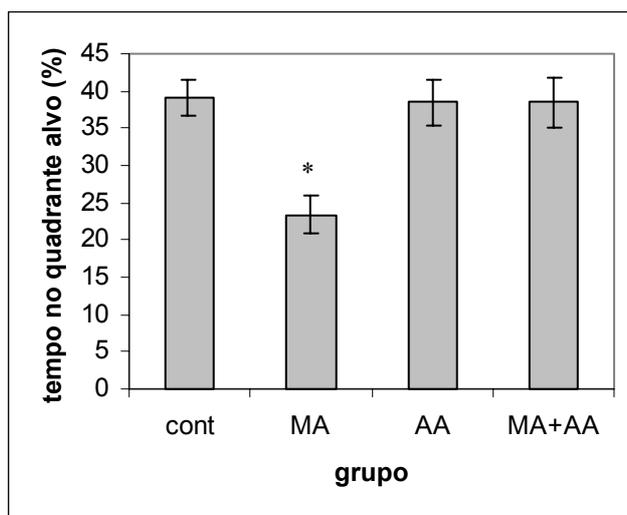


Figura IV.8. Teste da fase reversa. Tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava durante os treinos (expresso como porcentagem do tempo total). MA= ácido metilmalônico; AA= ácido ascórbico; MA+AA= ácido metilmalônico +ácido ascórbico. Valores expressos como média  $\pm$  SEM . \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos demais grupos (ANOVA seguida de teste de Duncan),  $n=11$ .

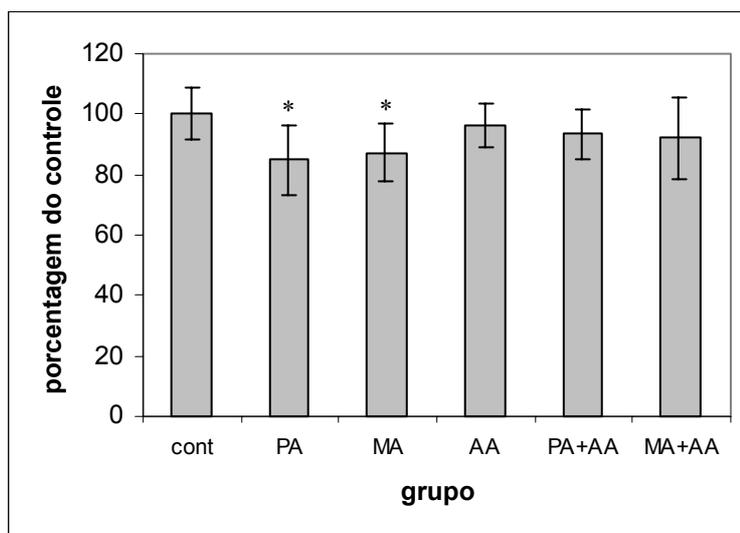


Figura IV.9. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA), ácido metilmalônico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido propiônico + ácido ascórbico (PA+AA) e ácido metilmalônica + ácido ascórbico (MA+AA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em hipocampo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$  SD, para um n= 6 a 9 ratos por grupo, e estão expressos em porcentagem do controle. \*  $p < 0.05$ , significativamente diferente dos controles (ANOVA seguida do teste de Duncan).

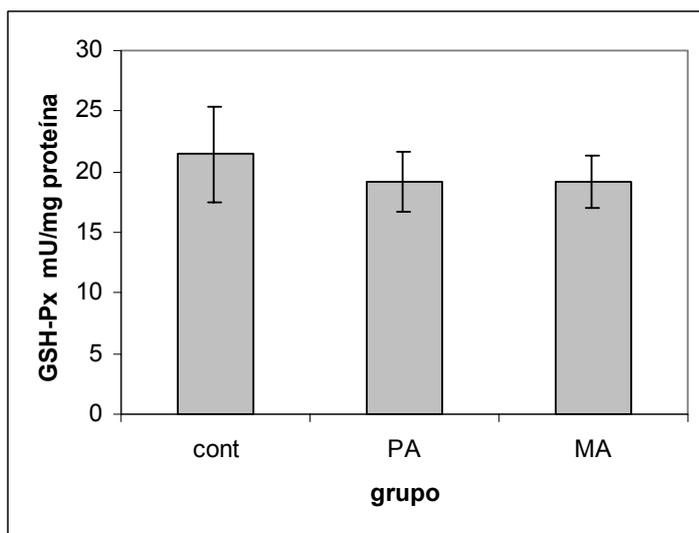


Figura IV.10. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) em hipocampo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$  SD e estão expressos como miliunidades de GSH-Px por miligrama de proteína. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA),  $n=6$ .

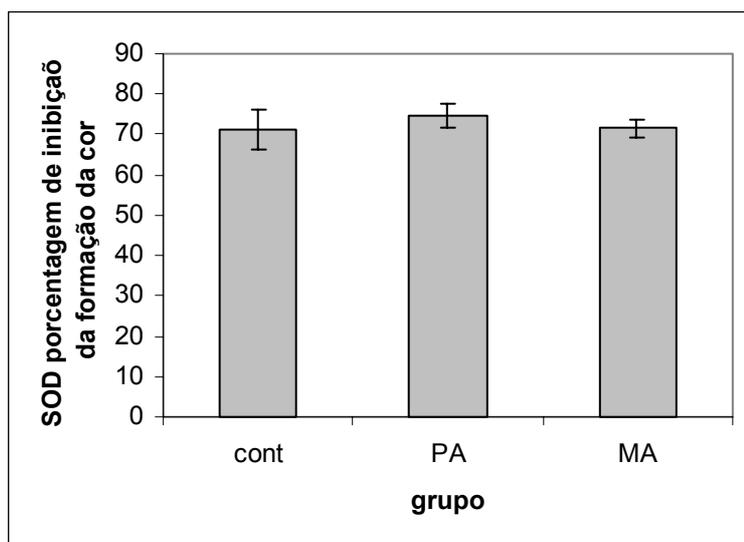


Figura IV.11. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em hipocampo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$  SD e estão expressos como porcentagem de inibição da formação da cor. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA), n= 6.

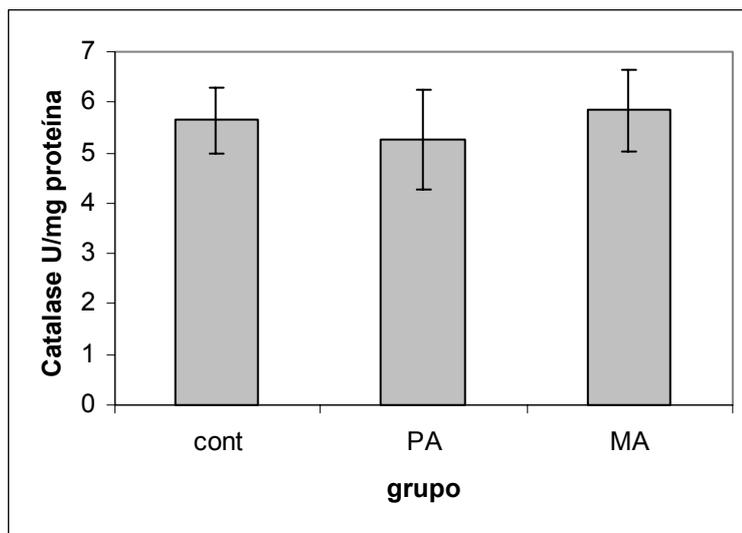


Figura IV.12. Efeito da administração crônica pós natal de ácido propiônico (PA) e ácido metilmalônico (MA) sobre a atividade da enzima catalase em hipocampo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$  SD e estão expressos em unidades de catalase por miligrama de proteína. Não houve diferença significativa em relação aos controles (ANOVA),  $n=6$ .

## V DISCUSSÃO

---

Pacientes afetados pelas acidemias propiônica e metilmalônica, mesmo sob protocolos de tratamento restrito, apresentam graus variáveis de retardo mental/psicomotor, sugerindo que o regime terapêutico disponível atualmente não tem sido plenamente satisfatório e que novas estratégias de tratamento devam ser perseguidas. Portanto, considerando que os mecanismos da disfunção neurológica nestas doenças são pouco conhecidos, acreditamos que a elucidação da fisiopatogenia do dano cerebral nas acidemias propiônica e metilmalônica poderá contribuir para melhorar a estratégia de tratamento. Neste contexto, recentemente tem sido sugerido que a produção de radicais livres causada pelo excesso de propionato e metilmalonato pode estar relacionada com o dano neurológico característico das acidemias propiônica e metilmalônica respectivamente (Nakao et alli., 1998; Fontella et alli., 2000; Fighera et alli, 1999). Alternativamente, a redução da produção energética causada pelo propionato e pelo metilmalonato também pode estar relacionada com o dano neurológico característico destes pacientes (Dutra et alli, 1993; Wajner et alli, 1992; Brusque et alli., 1997; Wyse et alli., 1998; Matsuishi et alli., 1991). Outra possibilidade é a combinação desses dois fatores, uma vez que um defeito na cadeia respiratória, que tem como consequência a redução na produção de energia, pode estimular a produção de radicais livres pelo bloqueio da transferência normal de elétrons através da cadeia. Esta é a hipótese mais aceita para explicar o aumento do estresse oxidativo encontrado em patologias neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (Cassarino e Bennett, 1999).

No presente estudo, produzimos níveis elevados e persistentes de propionato (PA) e metilmalonato (MA) no sangue e no cérebro de ratos em desenvolvimento (5<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup>

dia de vida), similares aos encontradas em seres humanos portadores das acidemias propiônica e metilmalônica, respectivamente. Para tal utilizamos os modelos previamente descritos de acidemias quimicamente induzidas e desenvolvidas em nosso laboratório (Brusque et alli., 1999; Dutra et alli, 1991). Os ácidos foram administrados durante um período de rápida proliferação celular e sinaptogênese em várias estruturas cerebrais envolvidas com aprendizado e memória em ratos (Dutra et alli.,1993; Winick and Noble, 1965; Roisen et alli., 1981; Dreyfus et alli., 1984).

Após os tratamentos, foi permitido aos animais que se recuperassem, e 30 dias mais tarde sua memória espacial e a atividade motora foram testadas no labirinto aquático de Morris e no campo aberto, respectivamente. Os ensaios bioquímicos foram realizados dezoito horas após o tratamento. Os animais foram sacrificados para a avaliação do potencial antioxidante total (TRAP) e atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em seus hipocampos.

Observamos inicialmente que a administração crônica de PA ou MA não alterou o peso corporal dos animais, indicando que esses metabólitos não causam desnutrição nos ratos. Esta informação é importante, uma vez que animais desnutridos poderiam reagir de forma diferente às tarefas comportamentais ou apresentar alterações em suas defesas antioxidantes. Uma vez que não houve nenhuma diferença entre os grupos, esta variável indesejável em estudos comportamentais e bioquímicos pode ser excluída da análise das alterações encontradas no nosso trabalho.

Em relação às tarefas cognitivas, os animais tratados com PA apresentaram um atraso na aquisição da tarefa do labirinto aquático de Morris. Para encontrar a plataforma, este grupo de animais necessitou de mais tempo de treino do que os demais grupos de animais, incluindo os grupos tratados com ascorbato e ascorbato com propionato. Estes resultados indicam que a administração crônica de PA causa um

déficit no aprendizado espacial (Block et alli., 1995). Os animais tratados com metilmalonato apresentaram a mesma velocidade de aquisição da tarefa que os demais grupos, indicando que o tratamento com metilmalonato não afetou o aprendizado espacial dos animais na tarefa do labirinto aquático de Morris, medido durante a fase de aquisição.

Também verificamos que os ratos que receberam administração crônica de PA permaneceram menos tempo (28% do tempo total da sessão) no quadrante alvo durante o teste da fase de aquisição, quando comparado aos demais grupos, que permaneceram de 43 a 49 % do tempo total da sessão no quadrante alvo. Este fato revela um déficit na memória do grupo tratado com PA. É importante salientar que o déficit de aprendizado e memória apresentado pelo grupo tratado com PA foi prevenido pela co-administração de ácido ascórbico, um seqüestrador de radicais livres. Portanto a habilidade do antioxidante em prevenir o déficit cognitivo demonstrado neste estudo sugere uma associação entre radicais livres/ estresse oxidativo e déficit cognitivo na acidemia propiônica.

Nossos resultados também mostraram que os animais tratados com PA apresentaram desempenho similar aos demais grupos no treino reverso, revelado pela latência semelhante e a presença da mesma aquisição da tarefa para todos os grupos estudados. Este resultado indica que todos os grupos de animais aprenderam uma estratégia para a realização da tarefa, porém não temos dados para afirmar se a estratégia foi a mesma para todos os grupos. Entretanto, os ratos que receberam PA permaneceram menos tempo no quadrante alvo durante o teste da fase reversa, indicando um déficit de memória. Estes resultados também podem ser um indício de que a estratégia utilizada pelos animais tratados com PA para encontrar a plataforma não é tão eficaz quanto a utilizada pelos demais grupos. Novamente, o grupo tratado

com PA+AA apresentou desempenho semelhante ao do grupo controle, indicando que a co-administração de ascorbato também preveniu este déficit cognitivo.

Em relação ao MA, durante a fase de aquisição, os animais apresentaram o mesmo desempenho dos demais grupos (controle, ascorbato e metilmalonato com ascorbato) tanto nos treinos quanto no teste. Durante o treino da fase reversa, novamente os animais tratados com MA apresentaram desempenho semelhante aos controles, indicando que estes animais realmente aprenderam uma estratégia para encontrar a plataforma submersa. Porém, no teste da fase reversa, estes animais apresentaram uma menor permanência no quadrante alvo, cerca de 25% do tempo total do teste, enquanto que os demais grupos (controle, ascorbato e metilmalonato com ascorbato) permaneceram cerca de 40 % do tempo total do teste no quadrante alvo. Este resultado podem indicar que os animais apresentaram déficit de memória.

Os déficits de navegação espacial, avaliados na tarefa do labirinto aquático de Morris, e apresentados pelos animais tratados com PA e menos intensamente pelos animais tratados com MA não podem ser atribuídos à diminuição da atividade motora pois não houve diferença entre os grupos no número de cruzamentos no campo aberto (parâmetro de atividade motora).

Eichenbaum e colaboradores (1990) demonstraram que animais com lesões no fórnix não apresentaram déficit para localizar a plataforma no labirinto aquático de Morris quando eles foram largados da mesma posição durante os treinos. Entretanto quando a posição de largada variou aleatoriamente, como em nossos experimentos, o déficit de localização apareceu. Estes achados sugerem que animais lesionados adotam estratégia de localização simples, que resultam em sucesso em algumas situações, ao invés de adotar um mapa espacial aloentríco, com o qual os animais se localizariam, não importando onde fossem colocados na piscina. A adoção de uma estratégia

inapropriada para relacionar objetos no espaço pode ser responsável por uma maior latência para encontrar a plataforma ou até mesmo explicar porque o grupo tratado com MA apresentou um bom desempenho na fase de aquisição e um mau desempenho no teste da fase reversa. Porém mais investigações serão necessárias para determinar se os animais tratados com PA ou MA adotaram estratégias diferentes dos outros grupos, ou se simplesmente houve falha na construção de seu mapa espacial aloccêntrico.

Estes resultados indicam claramente que a administração crônica de PA durante uma fase de rápido desenvolvimento do SNC dos ratos provoca alterações comportamentais de longo prazo no que se refere a aprendizado e memória espacial evidenciado na tarefa do labirinto aquático de Morris. Este achado está de acordo com estudos prévios de nosso laboratório que demonstraram que altos níveis de PA aplicados durante a fase de rápido desenvolvimento do cérebro provocam déficits de longo prazo no aprendizado e memória nas tarefas do campo aberto e esQUIVA INIBITÓRIA (Brusque et alli., 1999).

Observamos também que a administração de ácido ascórbico *per se* não afetou significativamente qualquer parâmetro comportamental analisado, e este dado está de acordo com a literatura mostrando que não há qualquer melhora na função cognitiva em animais ou seres humanos jovens e saudáveis sob tratamento de antioxidantes (Perrig et alli, 1997). Entretanto foi demonstrado que o tratamento com antioxidantes melhorou a função cognitiva de ratos velhos testados no labirinto aquático de Morris. Os ratos velhos tratados com antioxidantes durante 2 meses apresentaram uma melhor aquisição (desempenho durante o treino) e memória (desempenho durante o teste), quando comparados aos animais que receberam somente veículo (Socci et alli., 1995). Um estudo realizado com seres humanos demonstrou resultados similares de melhora da função cognitiva resultante de administração a longo prazo de uma mistura de

antioxidantes contendo ascorbato, vitamina B-6,  $\alpha$ -tocoferol, zinco e selênio a pacientes geriátricos com demência (Clausen et alli., 1989). Portanto, parece que tratamento com antioxidantes a longo prazo pode melhorar a performance cognitiva em tarefas onde o déficit cognitivo é associado ao envelhecimento no qual há acelerada perda neuronal. Isto é interessante tendo em vista que estudos recentes demonstraram que o aumento da geração de radicais livres é responsável por alguns dos efeitos deletérios do envelhecimento (Halliwell, 1992; Harman, 1992; Strong et alli., 1993; Matés et alli., 1999). Além disso, há fortes evidências de que os radicais livres podem estar envolvidos em várias enfermidades onde há morte neuronal e déficit cognitivo acelerado, como na doença de Parkinson, na doença de Huntington e na doença de Alzheimer (Halliwell e Gutteridge, 1999). Tendo em vista estas observações, os resultados presentes podem sugerir uma relação entre o déficit cognitivo de longo prazo provocado pelo PA e MA e um aumento no estresse oxidativo no cérebro.

Além disso, no presente trabalho também encontramos uma diminuição no potencial antioxidante total (TRAP) no hipocampo dos animais submetidos aos tratamentos crônicos com PA e MA. Tendo em vista que o hipocampo é uma estrutura fundamental para a localização espacial (Olton e Markowska, 1994; Save e Poucet, 2000) e que danos causados a esta estrutura costumam resultar em déficit de aprendizado e memória espacial (Netto et alli, 1993), é possível propor que os metabólitos PA e MA provocaram danos ao SNC provavelmente por estresse oxidativo, que poderiam explicar a deficiente performance dos animais encontrada nas tarefas comportamentais em nosso trabalho.

O TRAP resulta da relação entre as quantidades de antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) presentes no tecido e a produção de radicais livres, que consomem estes antioxidantes. Uma diminuição do TRAP pode ser explicada por um aumento da

produção de radicais livres, depletando a reserva de antioxidantes e/ou por uma diminuição da atividade de enzimas, síntese e/ou transporte de antioxidantes para o tecido. Entre os antioxidantes não enzimáticos destacamos o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e a glutatona, e entre os enzimáticos podemos citar a catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase.

Com o intuito de verificarmos se a diminuição do TRAP foi devida à depleção de um sistema antioxidante enzimático, medimos a atividade das enzimas glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Não encontramos alteração na atividade de nenhuma destas enzimas em nenhum dos grupos testados, indicando que os tratamentos administrados não interferiram na atividade de das enzimas antioxidantes testadas.

Além das enzimas antioxidantes estudadas, o cérebro contém outros sistemas antioxidantes, como a vitamina C a glutatona e a vitamina E. Nenhum destes sistemas foi analisado no presente trabalho. Por outro lado acreditamos que a diminuição no TRAP dos animais tratados com PA e MA não possa ser atribuída à depleção de ácido ascórbico, uma vitamina hidrossolúvel de meia vida muito curta no organismo. Os animais foram sacrificados 18 horas após a última injeção, sendo este tempo suficiente para que os níveis de ácido ascórbico no cérebro dos animais tratados com PA ou MA já tivessem retornado à normalidade. Além disso também não encontramos aumento no TRAP dos animais tratados com altas doses de ascorbato (100 mg/ Kg dia), o que reforça a idéia de que no momento que sacrificamos os animais os níveis de ascorbato em todos os grupos já estavam normais.

Por outro lado, Moyano e colaboradores (1997) demonstraram uma diminuição de  $\alpha$ -tocoferol em hemácias de pacientes com defeitos mitocondriais, incluindo a acidemia propiônica. Portanto, a depleção de vitamina E por um aumento da concentração de radicais livres no tecido induzida pela administração crônica de PA poderia explicar a

diminuição no TRAP encontrada em nosso estudo. Além da vitamina E a concentração de glutathiona poderia também ter sido afetada. Portanto a determinação dos níveis destes antioxidantes seria útil para uma melhor avaliação dos resultados encontrados.

Ao associarmos o déficit de aprendizado e memória na tarefa do labirinto aquático de Morris, com os dados bioquímicos (diminuição do TRAP em hipocampo) e com a prevenção das alterações comportamentais causada pela administração simultânea de ácido ascórbico, podemos sugerir que a administração crônica de PA e MA aumenta a produção de radicais livres, ou pelo menos gera um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a quantidade de defesas antioxidantes no hipocampo de ratos, deixando esta estrutura mais suscetível ao estresse oxidativo. Um aumento no estresse oxidativo no hipocampo poderia acarretar em dano tecidual nesta estrutura, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o déficit cognitivo encontrado nos ratos submetidos aos modelos crônicos de acidemia propiônica e metilmalônica. Se as alterações observadas neste trabalho também ocorrem nos pacientes com estas doenças, então é possível que o estresse oxidativo esteja envolvido com os danos neurológicos observados nos pacientes com estas acidemias. Considerando que o tratamento com vitamina C é seguro para ser utilizado a longo prazo (Diplock, 1995), e tendo em vista nossos resultados, estudos terapêuticos com este antioxidante poderiam ser realizados para avaliar se esta vitamina pode ser utilizada como tratamento coadjuvante destas doenças. Além disso, estudos complementares para verificar se a suplementação com  $\alpha$ - tocoferol reverte os efeitos sobre a cognição provocados pelo propionato ou metilmalonato seriam interessantes para que os resultados do presente estudo indicando efeito protetor de antioxidantes possam ser confirmados. Caso isso se confirme, um tratamento com vitamina C e/ ou E poderá futuramente ser utilizado, juntamente com o tratamento já existente, como

terapia complementar para as acidemias propiônica e metilmalônica, melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos por estas doenças.

## VI CONCLUSÕES

---

1. A administração crônica de propionato (PA), metilmalonato (MA) e ácido ascórbico (AA) do 5<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia de vida não afetou o peso corporal dos animais.
2. Os ratos tratados cronicamente com PA apresentaram um déficit de aprendizado da tarefa no labirinto aquático de Morris, durante a fase de aquisição.
3. Os ratos tratados cronicamente com PA apresentaram um déficit de memória durante a fase de aquisição e a fase reversa na tarefa do labirinto aquático de Morris.
4. O déficit de aprendizado e memória apresentado pelos animais tratados cronicamente com PA foi prevenido pela co-administração de AA.
5. Os ratos tratados cronicamente com MA apresentaram um déficit de memória na fase reversa da tarefa do labirinto aquático de Morris.
6. A co-administração de ácido ascórbico preveniu o déficit de memória provocado pelo tratamento crônico com MA.
7. A administração crônica de PA causou uma diminuição do potencial antioxidante total (TRAP) no hipocampo dos animais, indicando que houve depleção das defesas antioxidantes nesta estrutura cerebral.
8. A administração crônica de MA causou uma diminuição do TRAP no hipocampo dos animais, indicando que houve depleção de antioxidantes nesta estrutura.
9. A co-administração de AA com PA ou MA preveniu a diminuição do TRAP provocada por estes metabólitos no hipocampo dos animais.

10. Os resultados acima indicam que o déficit cognitivo provocado pela administração crônica de PA e MA na tarefa do labirinto aquático de Morris pode estar associado a um aumento de estresse oxidativo no hipocampo.

## VII REFERÊNCIAS

---

1. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **105**:121-126, 1984.
2. Alen, RG e Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radicals in Biology & Medicine.* **28** (3): 463-499, 2000.
3. Alexi, T; Borlongan, CV; Faull, RLM; Williams, CE; Clark, RG; Gluckman, PD e Hughes, PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology.* **60**:409-470, 2000.
4. Ando, T. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. *J. Biol. Chem.* **247**: 2200-2204, 1971.
5. Barash, V; Elpeleg, O; Amit, R; Gottfried, S; Yatziv, S e Gutman, A. Propionic acidemia- biochemical studies. *Israel J. of Med Sci.* **25**: 103-106, 1989.
6. Barnes, IA; Young, DG e Nocho, R. Methylmalonate excretion in vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Science* **140**: 76-77, 1963.
7. Beckman, JS e Koppenol, WH. NO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and ONOO<sup>-</sup>: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology.* **271**: C1424, 1996.
8. Bergendi, L; Benes, L; Duracková, Z e Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* **65**, 1865-1874, 1999.
9. Bergman, AJIW; Van Der Knapp, MS; Smeitink, AM; Duran, M; Dorland, L; Valk, J e Poll-the, BT. Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of brain in Propionic Acidemia: Clinical and Biochemical Considerations. *Pediatr. Res.* **40**:404-409, 1996.
10. Block, F; Schmitt, W e Schwarz, M. The antioxidant LY 231617 ameliorates functional and morphological sequelae induced by global ischemia in rats. *Brain Research.* **694**:308-311, 1995.

11. Block, F e Schwarz, M. Global ischemic neuronal damage relates to behavioral deficits: a pharmacological approach. *Neuroscience*. **82**:791-803, 1998.
12. Blom, W; Huijmans, JGM; Berg, GB e Van Den. A clinical biochemistry is view of the investigation of suspected inherited metabolic disease. *J. Inher. Metab. Dis.* **12**: 64-88, 1989.
13. Boehmer, T e Bremer, J. Propionylcarnitine, Physiological variations in vivo. *Bioch. Bioph. Acta.* **152**: 559-567, 1968.
14. Brusque, AM; Malfussi, HFC; Rocha, MP; Dutra-Filho, CS; Wannmacher, CMD e Wajner, M. Propionic acid inhibits in vitro CO<sub>2</sub> production in cerebellum and cerebral cortex of suckling rats. *Med. Sci. Res.***25**:347-349, 1997.
15. Brusque, AM; Terracciano, ST; Fontella, FU; Vargas, C; Silva, CG; Wyse, ATS; Trindade, VMT; Wannmacher, CMD e Wajner, M. Chronic administration of propionic acid reduces ganglioside N-acetylneuraminic acid concentration in cerebellum of young rats. *J. Neurol. Sci.* **158**: 121-124, 1998.
16. Brusque, A; Mello, CF; Buchanan, DN; Terracciano, ST; Rocha, MP; Vargas, CR; Wannmacher, CMD e Wajner, M. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. *Pharm. Biochem. Behav.* **64**:529-534, 1999.
17. Burton, BK. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*. **79**:359, 1987.
18. Cassarino, DS e Bennett Jr, JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Ver.* **29**: 1-25, 1999.
19. Chalmers, RA e Lawson, AM. Organic acids in man. In: Analytical Chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. London, Chapman and Hall, 221-229. 1982.

20. Clausen, J; Nielsen, SA e Kristensen, M. Biochemical and clinical effects of an antioxidative supplementation of geriatric patients. *Biol. Trace Element Res.* **20**:135-151, 1989.
21. Coude, FX, Sweetman, L e Nyhan, WL. Inhibition by propionyl- Coenzima A of N-Acethyl glutamate synthetase in rat liver mitochondria. *J. Clin. Invest.* **64**: 1544-1551, 1979.
22. Del Rio, R.M. Aminoacidopatias congenitas y sus repercusiones en el desarrollo del SNC., Madrid, 1962.
23. Delanty, N e Dichter, MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* **98**:145-153, 1998.
24. Diplock, AT. Savety of antioxidant vitamins and  $\beta$ -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**(suppl): 1510S-1516S, 1995.
25. Dreyfus, H; Ferret, B; Harth, S; Giorgio, A; Durand, M; Freysy, L e Massarelli, R. Metabolism and function of gangliosides in developing neurons. *J. Neurosci Res.* **12**:311-312, 1984.
26. Duran, M; Dorland, L; Bree, PK e Berger, R. Selective screening for aminoacid disorders. *Eur. J. Pediatr.* **153**: S33-S37, 1994.
27. Dutra, JC; Wajner, M; Wannmacher, CMD; Wannmacher, LE; Pires, RF e Rosa-Junior, A. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **24**: 595-605, 1991.
28. Dutra, JC; Wajner, M; Wannmacher, CMD; Dutra-Filho, CS e Rache, E. Inhibition of succinate dehidrogenase and beta-hidroxybutirate dehidrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J. Inherit. Metab. Dis.* **16**: 147-153, 1993.
29. Eichenbaum, H; Stewart, C e Morris, RGM. Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci.* **10**:3531-3542, 1990.
30. Evangelidou, A; Stumpf, DA e Parks, JK. Citrate syntase inhibition by acyl CoA esters. *Ann. Neurol.* **18**: 383-384, 1985.

31. Fenton, WA; Gravel, RAA e Rosenblatt, DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR; Beaudet ali; Sky WS e Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> New York: McGraw-Hill, 2001, p2165-2193.
32. Fighera, MR; Queiroz, CM; Stracke, MP; Brauer, MCN; González-Rodríguez, LL; Frussa-Filho, R; Wajner, M e Mello, CF. Ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport*. **10**: 2039-2043, 1999.
33. Fontella, F; Pulronick, V; Gassen, E; Wannmacher, CMD; Klein, AB; Wajner, M e Dutra-Filho, CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport*. **28**;11:541-4, 2000.
34. Glaslow, AM e Chase, P. Effect of propionic acid on fatty acid oxidation and ureagenesis. *Pediatr. Res*. **19**: 633-686, 1976.
35. Gregersen, N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl- CoA and isovaleryl- CoA. *Biochem. Med*. **26**: 20-27, 1981.
36. Halliwell, BH. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction?. *Ann. Neurol*. **32**:510-515, 1992.
37. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*. **344**:721-724, 1994.
38. Halliwell, B and Gutteridge, JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. New York, 3<sup>rd</sup> edition, 1999.
39. Harman, D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann. NY Acad. Sci*. **673**:126-141, 1992.
40. Hayasaka, K; Metoki, K; Satonh, T; Nakisawa, K; Tada, K; Kawakami, T; Matsuo, N e Aoki, T. Comparison of cytosolic and mitochondrial enzyme alterations in the livers of propionic and methylmalonic acidemia: are reduction of cytochrome oxidase activity. *Tohoker J. Exp. Med*. **137**: 329-334, 1982.
41. Herchkowitz, N. Inborn errors of metabolism affecting brain development introduction In: Cockbum, F e Gitzelmann, R, eds. *Inborn errors of metabolism in humans*. Lancaster, MTP Press Limited, p. 157-160. 1982.

42. Hoffmann, GF. Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. *Eur.J.Pediatr.* **153**: S2-S8, 1994.
43. Hommes, FA. Quality control for selective screening of inborn errors of metabolism. *Eur.J.Pediatr.* **153**: S17-S22, 1994.
44. Izquierdo, I. Aprendizaje y memoria. In: Fisiología Humana, de B. Housay, Tomo 4- Neurofisiología. Cingolani, HE e Houssay, AB. (eds), El Ateneo, Buenos Aires, 1989. P 311-319.
45. Lehnert, W; Sperl, W; Suormala, T e Baumgartner, CR: Propionic acidemia: Clinical, biochemical and therapeutic aspects. Experience in 30 patients. *Eur. J. Pediatr.* **153** (Suppl. 1): 68-80, 1994.
46. Lissi, E; Pascual, C e Del Castillo, MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Comms.* **17**:299-311, 1992.
47. Lo, D. Animals models of diseases and basic Science. *Horm. Metab. Res.* **28**: 296-298, 1996.
48. Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL e Randal, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-267, 1951.
49. MacLaughlin, BA; Nelson, D; Silver, IA; Erescinska, M e Chesselet, MF. Methylmalonate toxicity in primery neuronal cultures. *Neuroscience.* **86**: 279-290. 1998.
50. Matés, JM; Pérez-Gómez, C e Castro, IN. Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry.* **32**: 595-603, 1999.
51. Matsuishi, T; Stumpf, DA; Seliem, M; Eguren, LA e Chrislip, K. Propionate mitochondrial toxicity in liver and skeletal muscle: acyl CoA levels. *Biochem. Medic. Metab. Biol.* **45**:244-253, 1991.
52. Mello, CF; Begnini, J; Jiménez Bernal, RE; Rubin, MA; De Bastiani, J; Da Costa Jr, E e Wajner, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces ratational behavioral and convulsion through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* **721**: 120-125, 1996.

53. Morris, RGM; Garrud, P; Rawlins, JNP e O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. **297**:681-683, 1982.
54. Moyano, D; Vilaseca, MA; Pineda, M; Campistol, J; Vernet, A; Póo, P; Artuch, R e Sierra, C. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin. Chim. Acta*. **263**: 147-155, 1997.
55. Nakao, S; Moriya, Y; Furuyama, S; Niederman, R e Sugiya, H. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biology International*. **22**:331-337, 1998.
56. Netto, CA; Hodges, H; Sinden, JD; Le Peillet, E; Kershaw, T; Sowinski, P; Meldrum, BS e Gray, JA. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience*. **54**:69-92, 1993.
57. Olton, DS e Markowska, AL. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. *Neurotoxicology*. **15** (3): 439-444, 1994.
58. Orlando, M; Fiori, A e Costa, M. Methylmalonic aciduria and vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. **19**: 383-388, 1973.
59. Patel, MS; Owen, OE e Raefsky, C. Effect of methylmalonate in developing rat brain. *Life Sci*. **19**(1): 41-48, 1976.
60. Perrig, WJ; Perrig, P e Stähelin, HB. The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *J. Am. Geriatr. Soc*. **45** (6):718-24, 1997.
61. Roe, CR; Hoppel, CL; Stacey, TE; Chalmers, RA; Tracey, BM e Millington, DS. Metabolic response to carnitine in methylmalonic aciduria. An effective strategy for elimination of propionyl groups. *Arch Dis Child*. **58**(11):916-20, 1983.
62. Roisen, FJ; Bartfeld, H; Nagele, R e Yorke, G. Ganglioside stimulation of axonal sprouting *in vivo*. *Science*. **214**:577-578, 1981.
63. Save, E e Poucet, B. Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation. *Behav. Brain Res*. **109**: 195-206, 2000.

64. Scriver CR; Beaudet ali; Sky WS e Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8<sup>th</sup> New York: McGraw-Hill, 2001.
65. Sies, H e Stahl, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**(suppl): 1315S-1321S, 1995.
66. Socci, DJ; Crandall, BM e Arendash, GW. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Res.* **693**:88-94, 1995.
67. Stewart, PM e Walser, M. Failure of the normal ureagenic response to amino acids in organic acid loaded rats. Proposed mechanism for the hiperaminemia of propionic and methylmalonic acidemia. *J. Clin. Invest.* **66**: 484-492, 1980.
68. Strong, R; Mattamal, MB e Andorn, AC. Free radicals, the aging brain, and age-related neurodegenerative disorders. In: BPY, editor. Free radicals in aging, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, p 223-232.
69. Thomas, E. A study of the response to protein-modified diets for propionic acidemia in twelve patients. *Brain Dev.* **16**: 58-63, 1994.
70. Thomas, MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition.* **16**: 716-718, 2000.
71. Wajner, M; Brites, C; Dutra, JC; Buchalter, MS; Pons, AH; Pires, RF; Wannmacher, LE; Rosa Junior, A; Trindade, VMT e Wannmacher, CMD. Diminished concentrations of ganglioside N-acetilneuraminic acid (G-NeuAc) in cerebellum of young rats receiving chronic administration of methylmalonic acid. *J. Neurol. Sci.* **85**: 233-238, 1988.
72. Wajner, M; Dutra, JC; Cardoso, SE; Wannmacher, CMD e Motta, ER. Effect of methylmalonate on *in vitro* lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J. Inherit. Metab. Dis.* **15**: 92-96, 1992.
73. Walsh, RN e Cummins, RA. The open-field test: A critical review. *Psychol. Bull.* **83**:482-504, 1976.
74. Warren, SG e Juraska, JM. Sex differences and estropausal phase effects on water maze performance in aged rats. *Neurol Learn. Mem.* **74**:229-240, 2000.

75. Wendel, A. Glutathione Peroxidase. *Meth. Enzymol.* **77**:325-332, 1981.
76. Williamson, JR; Anderson, J e Browning, ET. Inhibition of gluconeogenesis by butylmalonate in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **245**(7): 1717-1726, 1969.
77. Winick, M e Noble, A. Quantitative changes in DNA, RNA and protein during prenatal and postnatal growth in rat. *Dev Biol.* **12**:451-466, 1965.
78. Wolf, B; Hasia, E; Sweetman, L; Gravel, R; Harris, DJ e Nyhan, WL. Propionic acidaemia: A clinical uptake. *J. Pediatr.* **99**:835-846, 1981.
79. Wyse ATS; Brusque, AM; Silva CG; Streck EL; Wajner M e Wannmacher CMD. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *NeuroReport.* **9**:1719-1721, 1998.