

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

EFEITO DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO E METILSUCÍNICO
SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO SISTEMA
GLUTAMATÉRGICO E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÉREBRO DE RATOS

VÂNIA PULROLNIK

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica - do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2003

Aos meus pais, Eduardo e Vanda, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Moacir Wajner, meu orientador, pelo trabalho pacífico que realizamos e por tornar-se meu amigo e “pai emprestado”, principalmente nas minhas horas de fragilidade.

A Carmen Regla Vargas, minha “orientadora vocacional” e amiga, por suas opiniões sempre construtivas e muito válidas, e por seu exemplo de profissional.

Ao pessoal do HCPA, em especial aos bolsistas do Laboratório de Análise de Metabólitos, pelo apoio e auxílio no início do trabalho.

A Alethéa, por ser uma excelente colega e agora amiga, e por termos uma sincronia admirável de trabalho.

A Fernanda Fontella, pela amizade sincera desde os tempos de iniciação científica, e pela pessoa fascinante que é.

Ao Dutra, meu camarada e primeiro orientador neste departamento.

As minhas fiéis e constantes escudeiras, Adriana Coitinho, Cecília Michalowski, Magda Perassolo e Rúbia Ruppenthal, por me provarem que amigos servem tanto para as horas boas quanto para aquelas nem tanto.

A Daniela Teixeira, minha amiga de alma gêmea, por sua paciência e compreensão imensuráveis nos momentos críticos.

A Fernanda de Oliveira, amiga de infância e parceira de filosóficas conversas sobre comportamento e crescimento individual, pelo seu contagiante alto-astral e incentivo para o que há de melhor.

A Luciane Zeni Tschöepke, por me ajudar a encontrar o caminho que trilhei até aqui.

Aos colegas de pós-graduação Alexandra Latini, Dênis de Assis, Letícia Pettenuzzo e Vilson Vasques, pela convivência e pela diversão compartilhada.

Aos bolsistas de iniciação científica César Ribeiro, Guilhian Leipnitz, Karina Scussiatto, Patrícia Schuck e Rita de Cássia Maria, pelo auxílio fundamental e insubstituível nas mais diversas técnicas realizadas neste trabalho.

A Ana Rúbia Bueno, Karina Dalcin e Vanessa Buffon, minhas “bolsistas maravilhosas”, pela cumplicidade e disponibilidade na última parte do trabalho.

A Cleide Gonçalves da Silva, por sua boa fé, cumplicidade e disposição para tudo que há de bom, além da paciência e disposição intermináveis para a formatação desta dissertação.

Ao Rafael Borba Rosa, por seu exemplo de dedicação e garra em tudo o que faz, e pelos momentos divertidíssimos que passamos.

Aos colegas pós-graduandos e bolsistas do laboratório 34, pelo empréstimo de material e pela amizade, em especial ao Emilio Luiz Streck (Xuxa).

Aos colegas pós-graduandos e bolsistas do laboratório 36, meu laboratório de origem, em especial à Claudia Tansini, pela paciência e parceria na tarde inesquecível da formatação da tese.

Ao Clóvis Wannmacher, pela constância de seu ótimo humor.

A Ângela Wyse, pelos “bons fluidos” e pelo exemplo de alto astral.

A Lisiane Porciúncula, pela disponibilidade repleta de muita paciência e dedicação no período “glutamatérgico” da dissertação.

Ao Marcos Frizzo, pela força e disposição para resolver nossos problemas com as fatias.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Ao meu pai, Eduardo, responsável direto por toda a minha afetividade, e à minha mãe, Vanda, por sua força e motivação, agradeço pelo incentivo constante, além do amor incondicional, sem o qual nada disso teria sentido.

Ao meu irmão Ricardo, pelo empréstimo do computador e pelo apoio moral de sempre.

A Deus, por sempre me iluminar, mesmo quando parecia não haver luz alguma, e também por me guiar sempre pelo melhor caminho.

Agradeço também àqueles que, embora não citados, contribuíram de forma importante para o andamento e conclusão desta dissertação de mestrado.

Obrigação!! ☺

RESUMO

A deficiência da enzima desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD) é um erro inato do metabolismo potencialmente letal que afeta o último ciclo da oxidação de ácidos graxos. O bloqueio da rota na conversão de n-butil-CoA a acetil-CoA resultante da deficiência enzimática leva ao acúmulo tecidual e aumento da concentração nos líquidos biológicos predominantemente dos ácidos etilmalônico e metilsucínico. Os pacientes afetados apresentam episódios de acidose metabólica intermitente, hiperamonemia, coma e acidose neonatal com hiperreflexia, miopatia por depósito de lipídios e hipotonia. Os sinais e sintomas dessa doença são variáveis, podendo aparecer em qualquer idade, do nascimento à vida adulta, e em combinações variáveis, frequentemente levando a episódios ameaçadores à vida de descompensação metabólica depois de um período de ingesta inadequada de calorias e/ou doença intercorrente. Tendo em vista que a patogênese do dano cerebral na deficiência da SCAD é pouco conhecida, no presente estudo investigamos a ação dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre alguns parâmetros envolvendo o sistema glutamatérgico e a produção de estresse oxidativo em cérebro de ratos jovens. Observamos inicialmente que o ácido etilmalônico promoveu uma diminuição significativa na captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mM. Já nas técnicas relacionadas à união de L-[³H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas, o ácido provocou uma diminuição da ligação de L-[³H]glutamato às membranas na ausência de sódio em todas as concentrações testadas (0,01 – 1,0 mM) e, quando em presença de sódio, houve diminuição da união somente na concentração de 1,0 mM do ácido. Por outro lado, não foi verificado qualquer efeito desse ácido sobre a captação vesicular de L-[³H]glutamato nas concentrações utilizadas. O ácido metilsucínico comportou-se de forma semelhante ao ácido etilmalônico nos parâmetros de captação de L-

[³H]glutamato por fatias e união de L-[³H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas. Houve uma diminuição da captação de glutamato por fatias de córtex cerebral, uma diminuição da união de L-[³H]glutamato na ausência de sódio em todas as concentrações e, na presença de sódio, uma diminuição da captação apenas na concentração de 1,0 mM. Por outro lado, distintamente do que ocorreu com o ácido etilmalônico, na captação vesicular observamos uma diminuição da captação em todas as concentrações testadas. Nossos resultados demonstram, desta forma, alterações importantes no sistema glutamatérgico pelos ácidos acumulados na deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta. A etapa seguinte foi investigar o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens: medida do potencial antioxidante total (TRAP), medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e medida de quimiluminescência. Foi verificado que os dois ácidos não afetam a lipoperoxidação, medida através do TBA-RS e quimiluminescência e tampouco as defesas antioxidantes não-enzimáticas, medidas através do TRAP. Embora não tenhamos medido o efeito dos ácidos sobre as defesas enzimáticas antioxidantes representadas pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, os resultados dos parâmetros analisados no presente trabalho sugerem que os ácidos acumulados na deficiência da SCAD não produzem estresse oxidativo.

ABSTRACT

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is an inherited metabolic disease that affects the last cycle of β -oxidation of fatty acids resulting in the accumulation of short chain fatty acids, mainly of ethylmalonic and methylsuccinic acids, formed from butyryl-CoA. The affected patients present metabolic acidosis episodes, hyperammonemia, coma and neonatal acidosis with myopathy due to lipid accumulation and hypotonia. The signs and symptoms are variable and appear in the neonatal period, but the main symptoms may appear during childhood or even at the adult age. Since the pathogenesis of the cerebral damage in SCAD deficiency is unknown, in the present work we investigated the effect of ethylmalonic and methylsuccinic acids about some parameters involving the glutamatergic system and oxidative stress production in brain of young rats. Initially we observed that ethylmalonic acid significantly decreased L-[3 H]glutamate uptake in cortical slices at 0.01, 0.1 and 1.0 mM concentrations. In addition, ethylmalonic acid decreased the L-[3 H]glutamate binding in plasmatic synaptic membranes in the absence of sodium at all tested concentrations (0.1 to 1.0 mM), and, when in the presence of sodium, there was a reduction of this binding only at 1.0 mM concentration. In contrast, no effect of this acid was observed on the vesicular uptake of L-[3 H]glutamate. Methylsuccinic acid had a similar effect on glutamate uptake by cortical slices and binding to synaptic membranes. Methylsuccinic acid, at all tested concentrations, decreased glutamate binding in the absence of sodium. In the presence of sodium, the acid reduced this parameter only at 1 mM concentration. As regards to glutamate vesicular uptake, methylsuccinic acid provoked a diminution at all tested concentrations. Our results demonstrate important alterations in glutamatergic system by the acids accumulating in SCAD deficiency. The next step was to investigate the effect of ethylmalonic and

methylsuccinic acid on various oxidative stress parameters in cerebral cortex of young rats, namely total antioxidant potential (TRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and chemiluminescence. It was verified that both acids did not affect lipoperoxidation, measured by TBARS and chemiluminescence and the antioxidant brain defenses, as measured by the TRAP. Although we did not measure the effect of these acids on the antioxidant enzymatic defenses represented by the enzymes dismutase superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, our results suggest that these metabolites did not induce oxidative stress.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XII
--------------------------	------------

ÍNDICE DE TABELAS	XIII
--------------------------	-------------

LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
------------------------------	------------

I. INTRODUÇÃO	1
----------------------	----------

I. 1. ERROS INATOS DO METABOLISMO	1
I. 1. 1. HISTÓRICO	1
I. 1. 2. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO DOS EIM	1
I. 1. 3. SINTOMATOLOGIA	6
I. 1. 4. ACIDÚRIAS ORGÂNICAS	9
I. 1. 4. 1. Diagnóstico	10
I. 2. DEFEITOS DO METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS	14
I. 2. 1. PRODUÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS	15
I. 2. 1. 1. β -Oxidação de ácidos graxos	15
I. 2. 2. DEFEITOS HEREDITÁRIOS DO METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS	21
I. 2. 2. 1. Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD)	25
I. 2. 2. 1. 1. Manifestações clínicas	26
I. 2. 2. 1. 2. Patogênese	26
I. 2. 2. 1. 3. Diagnóstico	28
I. 2. 2. 1. 4. Tratamento	29
I. 2. 2. 1. 5. Modelo animal da deficiência da SCAD	30
I. 3. O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	30
I. 3. 1. BIOSÍNTESE DE GLUTAMATO	31
I. 3. 1. 1. Ciclo glutamato-glutamina	31
I. 3. 2. GLUTAMATO E SEUS RECEPTORES	34
I. 3. 2. 1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR)	34
I. 3. 3. TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO	37
I. 4. RADICAIS LIVRES	40
I. 4. 1. DEFINIÇÃO	40
I. 4. 2. EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS RADICAIS LIVRES	41
I. 4. 3. ENVOLVIMENTO DE RADICAIS LIVRES EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	42
I. 4. 3. 1. Influência do estresse oxidativo na patogênese dos erros inatos do metabolismo	44
I. 4. 4. AGENTES ANTIOXIDANTES	44
I. 4. 4. 1. Definição	44

II. OBJETIVOS	46
----------------------	-----------

II. 1. GERAL	46
II. 2. ESPECÍFICOS	46

III.	MATERIAL E MÉTODOS	47
III. 1.	REAGENTES	47
III. 1. 1.	REAGENTES UTILIZADOS E OUTROS MATERIAIS DE CONSUMO	47
III. 1. 2.	EQUIPAMENTOS	49
III. 1. 3.	MATERIAL PERMANENTE	49
III. 2.	ANIMAIS	49
III. 3.	PREPARAÇÃO DAS FATIAS PARA A MEDIDA DA CAPTAÇÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO	50
III. 4.	CAPTAÇÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO POR FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL	50
III. 5.	PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS SINÁPTICAS PLASMÁTICAS	51
III. 6.	LIGAÇÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO EM MEMBRANAS SINÁPTICAS PLASMÁTICAS	52
III. 7.	PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS SINÁPTICAS	53
III. 8.	CAPTAÇÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO POR VESÍCULAS SINÁPTICAS	54
III. 9.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS MEDIDAS DE ESTRESSE OXIDATIVO	54
III. 10.	POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)	55
III. 11.	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS)	56
III. 12.	QUIMILUMINESCÊNCIA	57
III. 13.	MEDIDA DE PROTEÍNAS	57
III. 14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
IV.	RESULTADOS	59
IV. 1.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE A CAPTAÇÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO POR FATIAS DE CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS	59
IV. 2.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE A UNIÃO DE L-[³ H]GLUTAMATO EM MEMBRANAS SINÁPTICAS PLASMÁTICAS DE CÉREBRO DE RATOS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ÍONS SÓDIO NO MEIO DE INCUBAÇÃO	62
IV. 3.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE A CAPTAÇÃO DO L-[³ H]GLUTAMATO POR VESÍCULAS SINÁPTICAS DE CÉREBRO DE RATOS	67
IV. 4.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE O POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS	70
IV. 5.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE A MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS	72
IV. 6.	EFEITO <i>IN VITRO</i> DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO (AEM) E METILSUCÍNICO (AMS) SOBRE A QUIMILUMINESCÊNCIA EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS	75
V.	DISCUSSÃO	77
VI.	CONCLUSÕES	84
VII.	PERSPECTIVAS	86
VIII.	REFERÊNCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Protocolo para o diagnóstico laboratorial das acidúrias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise _____	11
Figura I.2. Ativação de um ácido graxo _____	16
Figura I.3. Ciclo da Carnitina _____	17
Figura I.4. Espiral da β -oxidação mitocondrial _____	18
Figura I.5. Formação de metabólitos na deficiência da SCAD originada pelo aumento do metabolismo alternativo de n-butilil-CoA _____	25
Figura IV.1. Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (AEM) sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos _____	60
Figura IV.2. Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico (AMS) sobre a captação de L-[3 H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos _____	61
Figura IV.3. Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (AEM) sobre a união de L-[3 H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos, na ausência de íons sódio no meio de incubação _____	63
Figura IV.4. Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[3 H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na ausência de íons sódio no meio de incubação _____	64
Figura IV.5. Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (AEM) sobre a união de L-[3 H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na presença de íons sódio no meio de incubação _____	65
Figura IV.6. Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[3 H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na presença de íons sódio no meio de incubação _____	66
Figura IV.7. Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (AEM) sobre a captação do L-[3 H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos _____	68
Figura IV.8. Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico (AMS) sobre a captação do L-[3 H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos _____	69
Figura IV.9. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens _____	71
Figura IV.10. Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (AEM) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens _____	73
Figura IV.11. Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico (AMS) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens _____	74
Figura IV.12. Efeito <i>in vitro</i> dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens _____	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1. Classificação dos erros inatos do metabolismo (EIM) _____	3
Tabela I.2. Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, galactosemia, intolerância hereditária à frutose) _____	7
Tabela I.3. Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, doenças peroxissomais, etc) _____	8
Tabela I.4. Indicações para a determinação de ácidos orgânicos na urina _____	12
Tabela I.5. Apresentação clínica dos defeitos de oxidação dos ácidos graxos _____	22
Tabela I.6. Achados clínicos nos defeitos de β -oxidação mitocondrial _____	24
Tabela I.7. Investigação utilizada na avaliação de pacientes com uma possível desordem do transporte de ácidos graxos e de oxidação mitocondrial _____	28
Tabela I.8. Tratamento dos defeitos hereditários da β -oxidação _____	29
Tabela I.9. Família dos transportadores de glutamato _____	38
Tabela I.10. Efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO [•]) _____	42
Tabela I.11. Motivos que tornam o cérebro especialmente vulnerável ao estresse oxidativo _____	42
Tabela I.12. Antioxidantes não enzimáticos encontrados no plasma humano _____	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AEM	ácido etilmalônico
AMS	ácido metilsucínico
Ca ⁺²	íon cálcio
CG	cromatografia gasosa
CG/MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CuZnSOD	cobre-zinco superóxido dismutase
EIM	erros inatos do metabolismo
Fe ⁺²	íon ferroso
Fe ⁺³	íon férrico
GSH	glutathiona (forma reduzida)
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSSG	glutathiona (forma oxidada)
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO [•]	radical hidroxila
MnSOD	manganês superóxido dismutase
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)
NADH ₂	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida)
NO [•]	óxido nítrico
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
OH ⁻	ânion hidroxila
ONOO [•]	peroxinitrito
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TRAP	potencial antioxidante total

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Erros Inatos do Metabolismo

I. 1. 1. Histórico

Em 1908, o inglês Archibal Garrod introduziu na literatura médica o termo erros inatos do metabolismo (EIM), quando estudava indivíduos afetados com alcaptonúria, cistinúria, pentosúria e albinismo. Graduado em química e medicina, observou pacientes que excretavam na urina quantidades aumentadas de determinadas substâncias intermediárias do metabolismo. Garrod propôs que o acúmulo dessas substâncias era derivado de um bloqueio parcial ou total nas suas rotas de oxidação, por deficiência de uma enzima responsável por uma reação específica para cada caso.

Essas doenças geralmente ocorriam em irmãos, filhos de pais normais consangüíneos, sugerindo um modelo de herança autossômica recessiva, baseando-se então nas Leis de Mendel que haviam sido redescobertas. A correlação entre síntese de uma proteína e um gene específico só foi desenvolvida por Beadle meio século após (1945), permitindo explicar a causa de mutações nos genes das enzimas envolvidas. O primeiro defeito enzimático causador de uma doença genética foi demonstrado por Gibson em 1948. Entretanto, a hipótese de Garrod só foi confirmada em 1958, quando La Du e colaboradores comprovaram a deficiência da oxidase do ácido homogentísico no fígado de um paciente com alcaptonúria.

I. 1. 2. Conceito e classificação dos EIM

Erros inatos do metabolismo (EIM) são defeitos hereditários que ocorrem em rotas metabólicas, quase sempre devidos à deficiência na atividade de uma enzima. A ausência

ou deficiência severa da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos e seus derivados, com repercussão clínica variável no indivíduo, dependendo da importância da rota afetada. No entanto, geralmente provocam sintomatologia grave e, algumas vezes, letal. Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (Scriver *et al*, 2001).

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

a) desordens de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas no rim ou no intestino. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio;

b) desordens de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomas, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose;

c) desordens de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estruturais, etc. Exemplo: hiperplasia adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima de 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia;

d) desordens do metabolismo intermediário: envolvem deficiências enzimáticas das rotas de metabolização de moléculas pequenas (aminoácidos, glicídios, neurotransmissores, etc), podendo comprometer rotas importantes como os ciclos dos ácidos tricarboxílicos e da uréia, ou rotas relacionadas a estas. O bloqueio produz o acúmulo de substrato da enzima deficiente, bem como dos metabólitos produzidos a partir deste, além da deficiência do produto final da rota, caso não possa ser suprido

por outra via metabólica. O acúmulo de metabólitos tóxicos pode causar outras alterações bioquímicas secundárias e danos nos tecidos. Como esses produtos são liberados na circulação, podem prejudicar outros tecidos, sendo finalmente excretados na urina. Constituem o maior grupo dos EIM e têm como exemplos as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas, da frutose, galactose, pentose e outros.

Outra classificação de EIM leva em conta a área do metabolismo afetada com especial ênfase para os metabólitos acumulados (Tabela I.1.).

Tabela I.1. Classificação dos erros inatos do metabolismo (EIM) (baseada em Scriver *et al*, 2001).

<i>EIM DOS CARBOIDRATOS</i>
Diabetes melitus
Defeitos no metabolismo da frutose
Defeitos no metabolismo do glicogênio (glicogenoses)
Defeitos no metabolismo da galactose
Pentosúria
<i>EIM DOS AMINOÁCIDOS</i>
Hiperfenilalaninemias
Tirosinemia e desordens relacionadas
Defeitos no metabolismo da histidina
Defeitos no metabolismo da prolina e hidroxiprolina
Hiperornitinemias
Defeitos no ciclo da uréia
Defeitos no metabolismo da lisina
Defeitos no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina, isoleucina)
Defeitos na transulfuração
Sarcosinemia
Hiperglicinemia não cetótica
Defeitos nos beta-aminoácidos livres e em peptídeos
<i>EIM DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS</i>
Alcaptonúria
Acidúrias orgânicas de cadeia ramificada
Defeitos no metabolismo do propionato e metilmalonato
Acidúrias orgânicas por defeitos no metabolismo da lisina
Desordens do ciclo gama-glutamil
Acidemia láctica
Deficiência de acil-CoA desidrogenases
Acidemia glutárica tipo II e deficiência na cadeia respiratória mitocondrial
Hiperoxalúrias primárias
Defeitos no metabolismo do glicerol

EIM DAS PURINAS E PIRIMIDINAS

Defeitos no metabolismo das purinas
Defeitos no metabolismo das pirimidinas

EIM DAS LIPOPROTEÍNAS

Deficiência de apolipoproteínas
Deficiências enzimáticas do metabolismo das lipoproteínas
Deficiência de receptores para lipoproteínas
Deficiência das proteínas “transferidoras”
Doenças familiares de armazenamento de glicerol

EIM DAS PORFIRINAS E HEME

Porfirias

EIM DAS BILIRRUBINAS

Síndrome de Crigler-Najjar
Síndrome de deficiência de uridina difosfato glicuronil transferase tipo II
Síndrome de Gilbert
Síndrome de Dubin-Johnson
Síndrome de Rotor
Colestase intra-hepática recorrente benigna

EIM DOS METAIS

Defeitos no transporte de cobre
Hemocromatose
Defeitos no cofator molibdênio

DESORDENS DOS PEROXISSOMAS

Defeitos na biogênese dos peroxissomas
Adrenoleucodistrofia
Doença de Refsum
Acatasemia

DOENÇAS LISSÔMICAS

Mucopolissacaridoses
Mucopolidoses
Defeitos na degradação de lipoproteínas
Defeitos de lipase ácida lisossômica
Doença de Farber
Lipidose esfingomielina-colesterol
Doença de Gaucher
Doença de Krabbe
Sulfatídeo lipidose
Doença de Fabry
Doença de Schindler
Gangliosidoses

EIM DOS HORMÔNIOS (síntese e ação)

Defeitos do metabolismo da tireóide
Hiperplasia adrenal
Síndrome de resistência a andrógenos
Deficiência de esteróide sulfatase
Defeitos do hormônio do crescimento
Diabete insipidus nefrogênico familiar
Pseudohipoparatireoidismo
Defeitos do metabolismo da vitamina D e outros calciferóis

EIM DAS VITAMINAS

Defeitos no metabolismo do folato
Defeitos no metabolismo da cobalamina
Defeitos no metabolismo da biotina

EIM DO SANGUE E TECIDOS HEMATOPOÉTICOS

Deficiência de fatores de coagulação vitamina K-dependentes
 Deficiência do fator XIII e fibrinogênio
 Deficiência do fator VIII e fator V
 Doença de Von Willebrandt
 Defeitos na ativação por contato (deficiência de fator XI, XII, pré-caliceína e cininogênio)
 Defeitos de antitrombina
 Defeitos hereditários das plaquetas
 Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
 Metahemoglobina hereditária enzimopênica
 Hemoglobinopatias
 Deficiência de piruvato quinase e de outras enzimas eritrocitárias
 Defeitos na membrana do eritrócito (esferocitose e eliptocitose)
 Deficiência de alfa-1-antitripsina
 Amiloidose

EIM DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA

Sistema contratransporte glicose/sódio
 Cistinúria
 Aminoacidúrias catiônicas
 Doença de Hartnup
 Iminoglicinúria familiar
 Acidose tubular renal
 Hipofosfatemias
 Hiperuricemia renal hereditária
 Defeitos no transporte lisossômico
 Fibrose cística

EIM DOS MECANISMOS DE IMUNIDADE DE DEFESA

Síndrome de deficiências imunoglobulinas
 Imunodeficiência de linfócitos B e T
 Desordens do sistema do complemento
 Discinesia ciliar primária (Síndrome de Kartagener)
 Defeitos na mobilidade de leucócitos
 Defeitos hereditários dos fagócitos “killer”

EIM DO TECIDO CONJUNTIVO

Desordens do colágeno
 Hipofosfatase
 Síndrome de deficiência de anidrase carbônica tipo II
 Distrofias musculares

EIM DA PELE

Albinismo
 Xeroderma pigmentosum

EIM DO INTESTINO

Deficiência hereditária de dissacaridases

A identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso não é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (Golpertz, 1974; Warrs *et al*, 1975).

I. 1. 3. Sintomatologia

Os pacientes portadores de erros inatos do metabolismo apresentam sintomas muito variados e inespecíficos, inclusive aqueles que possuem o mesmo distúrbio, pois a expressividade é muito variável. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo envolvida e tecidos afetados. Algumas manifestações clínicas aparecem com maior frequência no período neonatal, tais como deficiência no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) podem aparecer mais tarde (Burton, 1987).

Uma gama de sintomas e sinais clínicos deve alertar o médico para esse grupo de patologias. A forma de aparecimento dos sintomas é um fator importante na distinção entre os dois grandes grupos de EIM: erros inatos devido a alterações do metabolismo intermediário e erros inatos devidos ao depósito celular de macromoléculas. Os defeitos do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de moléculas pequenas (ex., aminoácidos e ácidos orgânicos) geralmente têm uma apresentação clínica súbita e a evolução se caracteriza por episódios de agudização recorrentes geralmente precedidos por infecções, ingestão alimentar exagerada de alimentos específicos, cirurgia, jejum ou outras condições de catabolismo elevado, pois nestas situações ocorre degradação de proteínas ou lipídeos que vão originar os metabólitos tóxicos (ex., defeitos do ciclo da uréia e acidemias orgânicas). Nos intervalos entre as crises, os pacientes podem estar clinicamente normais. Para muitas destas doenças é, portanto, essencial que as amostras para análise laboratorial sejam coletadas nos momentos de crise metabólica. O exame físico geralmente é inespecífico, assim como os exames histopatológicos dos órgãos mais afetados. O tratamento agudo com restrição alimentar específica (proteínas, lipídeos ou glicídeos)

associado ou não à suplementação de vitaminas (que ajudam as reações enzimáticas) mostra resultados extraordinários, retirando o paciente da crise em poucas horas. Um outro grupo dessas patologias mostra uma evolução crônica desde o nascimento ou nos primeiros meses ou anos de vida. Nesses casos, a intoxicação é crônica (ex.: fenilcetonúria) e os afetados apresentam um atraso na aquisição das habilidades motoras (ex.: caminhar), não adquirindo em muitos casos as habilidades cognitivas normais. A tabela I.2. mostra os principais achados clínico-laboratoriais que devem levar à suspeita de um EIM de intoxicação ou de deficiência energética (erros inatos devidos a alteração em moléculas pequenas).

Tabela I.2. Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, galactosemia, intolerância hereditária à frutose).

NEONATO

Vômitos incoercíveis, recusa alimentar
 Hipotonia/hipertonia
 Letargia, coma intermitente
 Convulsões de causa desconhecida
 Mioclonias
 Miopatia/cardiomiopatia
 Taquipnéia/apnéia
 Dismorfismo
 Odor peculiar na urina ou no paciente
 Macrocefalia

CRIANÇA ATÉ OS 10 ANOS DE IDADE

Intolerância alimentar
 Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor
 Ataxia, hipotonia, coreoatetose, paraparesia espástica, marcha anormal, microcefalia/macrocefalia, distúrbio de comportamento
 Hepatomegalia/hepatopatia, pancreatite, urolitíase, disfunção tubular renal
 Deslocamento de cristalino, atrofia ótica
 Alterações esqueléticas
 Alopecia, alterações pigmentares na pele e cabelos
 Odor peculiar na urina ou no paciente
 Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

ADOLESCENTE ATÉ A FASE JUVENIL

Retardo mental, estupor ou ataxia episódica, sintomas neuropsiquiátricos, letargia, coma
 Oclusão vascular prematura
 Hepatomegalia, urolitíase
 Deslocamento do cristalino, retinite pigmentar
 Alterações esqueléticas
 Odor peculiar
 Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

Os EIM de moléculas complexas ou de organelas (doenças lisossômicas de depósito e peroxissomais) manifestam-se na sua quase totalidade de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos (fígado, baço, medula óssea e encéfalo) em que os substratos (glicogênio, lipídeos complexos, mucopolissacarídeos) que não podem ser degradados ali se depositam. É comum encontrar nesses pacientes dismorfias e sinais clínicos específicos (hepatomegalia, esplenomegalia, leucodistrofia, etc). A doença geralmente se manifesta após os primeiros meses ou anos de vida e é comum o afetado perder as habilidades motoras e cognitivas que já tinham sido adquiridas. Os exames histopatológicos, nos afetados por várias dessas doenças são bastante informativos (presença de glicogênio no fígado nas glicogenoses, de lipídeos específicos em vários tecidos nas lipidoses, etc). O tratamento dessas doenças, no entanto, é bastante escasso. A tabela I.3. mostra sinais clínicos que levam à suspeita de doenças de moléculas complexas.

Tabela I.3. Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, doenças peroxissomais, etc).

Retardo mental progressivo
Dismorfias (gargolismo, etc.)
Anormalidades no esqueleto
Hepatoesplenomegalia
Atraso no desenvolvimento
Opacidade de córnea
Comportamento agressivo/Irritabilidade
Dificuldade auditiva e visual

I. 1. 4. Acidúrias orgânicas

Acidúrias orgânicas são doenças hereditárias autossômicas recessivas em que ocorre acúmulo tecidual de um ou mais ácidos carboxílicos (Chalmers *et al*, 1982; Scriver *et al*, 2001). São causadas por bloqueio metabólico devido à deficiência severa da atividade de uma enzima, usualmente do metabolismo dos aminoácidos, podendo também comprometer o metabolismo dos lipídeos ou dos carboidratos. Há mais de 60 destes distúrbios cuja etiologia está bem definida.

Em uma visão mais ampla, os defeitos de oxidação de ácidos graxos, constituído por 22 defeitos bioquímicos e caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo de ácidos dicarboxílicos de cadeia média de carbonos (ácidos adípico, subérico e sebácico), bem como de vários ácidos carboxílicos específicos para cada doença, também podem ser considerados como acidúrias orgânicas (Rinaldo *et al*, 1998; Roe e Coates, 2001).

Recentemente utilizou-se o termo acidúrias orgânicas cerebrais para aqueles distúrbios do metabolismo de ácidos orgânicos com manifestações fundamentalmente neurológicas, sem comprometimento clínico-laboratorial sistêmico (acidose metabólica, hipoglicemia, etc.) (Hoffmann *et al*, 1993; Hoffmann *et al*, 1994). Os sintomas predominantes são ataxia, abalos mioclônicos, sinais extrapiramidais, retardo mental, crises encefalopáticas com convulsões e macrocefalia. A neuropatologia caracteriza-se por desmielinização progressiva, lesões em gânglios da base, degeneração cerebelar e anormalidades no tálamo, hipotálamo, medula e pedúnculo cerebral.

A prevalência das acidúrias orgânicas na Holanda, um país modelo para o estudo dos erros inatos do metabolismo, é tida como a mais aproximada da realidade, estimando-se 1 para cada 2200 habitantes, enquanto na Arábia Saudita, onde a taxa de

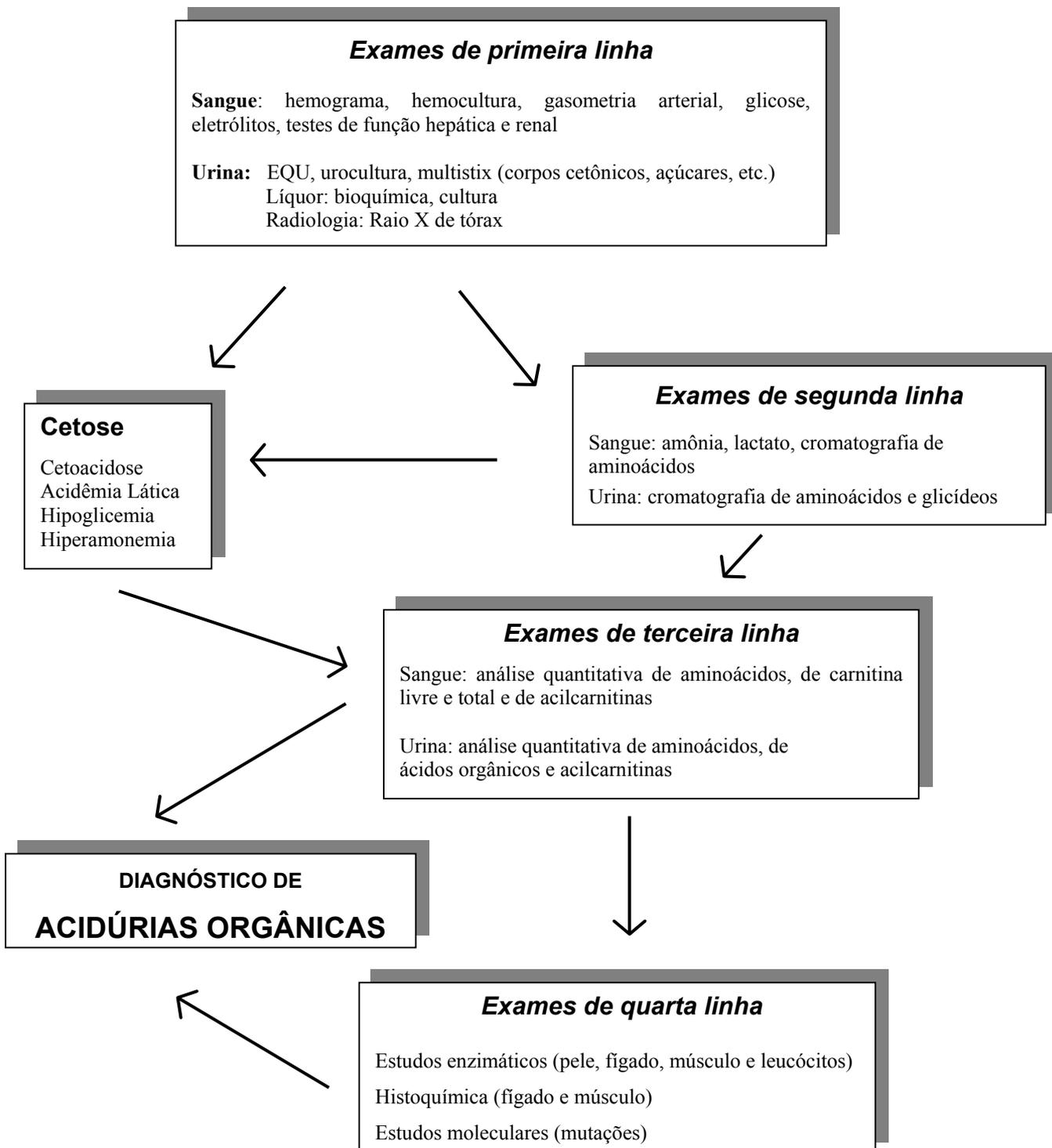
consangüinidade é elevada, a estimativa é de pelo menos 1:740 nascimentos (Rashed *et al*, 1994; Hoffmann *et al*, 1994).

Relativamente a outros grupos de erros inatos do metabolismo (EIM), as acidemias orgânicas são consideradas as mais freqüentes doenças metabólicas em crianças severamente enfermas (Chalmers *et al*, 1980; Wajner *et al*, 1986) e dos mais freqüentes grupos de enfermidades hereditárias do metabolismo (Hoffmann *et al*, 1994).

I. 1. 4. 1. Diagnóstico

Embora o diagnóstico clínico dessas doenças seja difícil dada a variabilidade da sintomatologia para a maioria delas, os sinais mais evidentes são neurológicos, o que atesta a suscetibilidade do sistema nervoso central à toxicidade dos ácidos orgânicos acumulados. A figura I.1. mostra alguns passos para o diagnóstico destas doenças. O desenvolvimento da cromatografia gasosa aplicada para a detecção de ácidos orgânicos em líquidos biológicos possibilitou o diagnóstico das acidúrias orgânicas e a detecção de um número crescente de novos distúrbios (Tanaka *et al*, 1966). A análise de ácidos orgânicos é feita por cromatografia gasosa (CG) em colunas capilares longas ou, de preferência, por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG/MS) (Sweetmann *et al*, 1995).

Figura I.1. Protocolo para o diagnóstico laboratorial das acidúrias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise.



A análise dos ácidos orgânicos é usualmente feita em uma amostra ocasional de urina, devendo-se dar preferência, quando possível, à primeira amostra matinal, após o jejum noturno ou, preferentemente, a amostras colhidas durante crises de descompensação. Outros líquidos biológicos (soro, líquido, humor vítreo ou bile) têm pouco valor para o diagnóstico das acidúrias orgânicas, mas tornam-se necessários quando do advento de morte súbita sem diagnóstico definido, ou para os casos de suspeita de defeitos de oxidação de ácidos graxos, ou nas acidemias orgânicas “cerebrais”.

A tabela I.4. mostra as principais indicações para a análise de ácidos orgânicos.

Tabela I.4. Indicações para a determinação de ácidos orgânicos na urina.

Crise metabólica de causa desconhecida (acidose metabólica, acidemia láctica, aumento do ânion gap, hipoglicemia, cetonemia, cetonúria neonatal, hiperamonemia, citopenia)
Manifestações clínicas de intoxicação sistêmica
Acidose metabólica persistente
Hepatopatia de causa desconhecida
Doença neurológica de causa desconhecida
Encefalopatia com convulsões
Doença multissistêmica com sintomas progressivos
Distúrbio de metabolismo energético suspeito

O diagnóstico correto de uma acidúria orgânica depende da identificação de vários metabólitos (ácidos orgânicos) específicos. A verificação de apenas um metabólito elevado geralmente não é muito elucidativa no diagnóstico destes distúrbios, uma vez que indica a possibilidade de vários distúrbios. Muitas vezes um diagnóstico é somente conseguido através de análise repetitiva de amostras coletadas em períodos distintos, especialmente durante descompensação metabólica, quando os níveis dos metabólitos anormais

umentam sua concentração. Outras vezes testes de sobrecarga com substratos proximais ao bloqueio metabólito são necessários para detectar os metabólitos anormais. Por outro lado, em alguns casos a excreção urinária dos metabólitos característicos não ocorre e o diagnóstico só é feito pela determinação da atividade enzimática em células cultivadas (fibroblastos). Outras situações clínicas, tais como em crianças severamente enfermas que não possuem acidúria orgânica, pode ocorrer aumento na excreção de vários metabólitos ácidos relacionados com hipóxia (ácidos láctico, glutárico, glutacônico, ácidos dicarboxílicos e intermediários do ciclo de Krebs). Todas essas situações devem ser bem analisadas para o sucesso do diagnóstico final. É importante frisar que dados precisos sobre a condição clínica do paciente, sobre a dieta e medicação são informações indispensáveis para uma ótima interpretação dos resultados de ácidos orgânicos.

O diagnóstico dos defeitos de oxidação de ácidos graxos é feito especialmente durante as crises de descompensação metabólica pela presença de ácidos dicarboxílicos na urina, ou em qualquer momento pela detecção de altas quantidades de ácidos graxos característicos de cada doença, baixa quantidade de corpos cetônicos relativa a dos ácidos dicarboxílicos, baixa carnitina livre e principalmente por aumento de acilcarnitinas no sangue.

O estudo enzimático das acidúrias orgânicas é importante para se caracterizar o defeito bioquímico e mesmo avaliar o prognóstico dos pacientes, considerando-se a atividade residual da enzima defeituosa. Neste particular, a biópsia de pele com cultivo de fibroblastos, a biópsia de fígado por punção e de músculo esquelético são fundamentais para a determinação das atividades enzimáticas para o diagnóstico definitivo de algumas dessas entidades. O fígado e o músculo esquelético são também úteis para os estudos histopatológicos em vários destes distúrbios que mostram alterações características

(mitocondriopatias com “ragged fibers” no músculo esquelético, defeitos de oxidação de ácidos graxos com depósito micro ou macrovesicular de lipídeos no fígado, deficiência da glicose-6-fosfatase com depósito de glicogênio no fígado, etc).

Os estudos moleculares estão também disponíveis para algumas acidúrias orgânicas e são feitos através do estudo das mutações. São particularmente úteis para confirmar o diagnóstico de algumas destas entidades onde o diagnóstico bioquímico ou enzimático não pode ser feito, ou em doenças que se caracterizam por mutações preponderantes, para o diagnóstico das doenças mitocondriais, para avaliar o prognóstico em algumas acidúrias com boa correlação genótipo/fenótipo, para estudos familiares e para o diagnóstico pré-natal.

Em algumas ocasiões a criança afetada morre sem definição do diagnóstico da doença metabólica genética suspeita. Nestes casos é essencial coletar amostras *postmortem* para o esclarecimento diagnóstico e posterior aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Os estudos mais importantes para estas situações são a determinação quantitativa de aminoácidos no plasma e líquido cefalorraquidiano, a determinação de ácidos orgânicos na urina e de acilcarnitinas em plasma, urina, bile ou papel de filtro impregnado com sangue ou plasma.

I. 2. Defeitos do metabolismo de ácidos graxos

Dentro do grupo das acidemias orgânicas destaca-se uma série de distúrbios do metabolismo de ácidos graxos pela sua frequência alta na população em geral.

Descreveremos a seguir alguns aspectos do metabolismo de ácidos graxos.

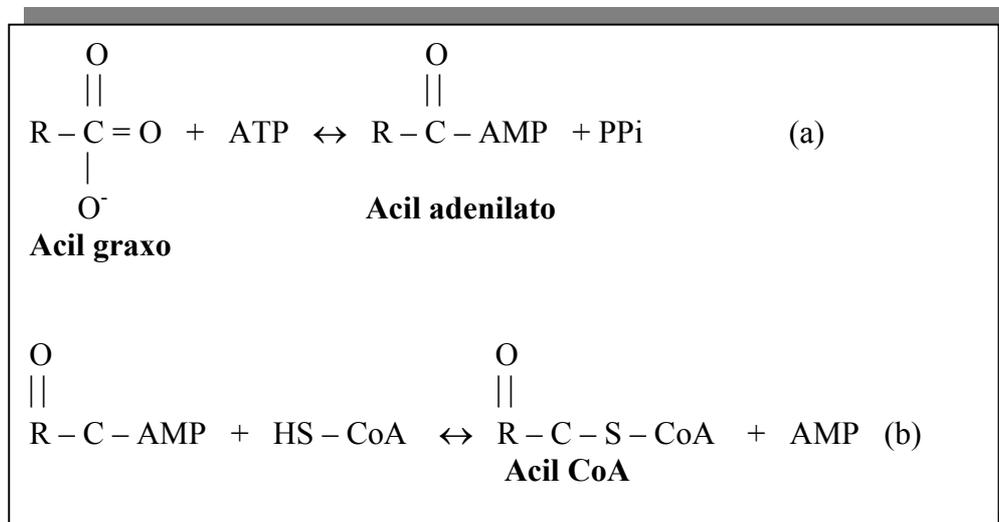
I. 2. 1. Produção de energia a partir de ácidos graxos

A principal fonte endógena de energia em seres humanos é a oxidação dos ácidos graxos armazenados nos adipócitos na forma de triglicerídios, que são em sua maioria convertidos nas mitocôndrias em acetil coenzima A (acetil-CoA), usada como substrato para as reações do ciclo de Krebs, que culminam na produção de ATP, CO₂ e H₂O nos tecidos periféricos. No fígado, entretanto, durante o jejum e o exercício prolongado a maioria da acetil-CoA originada da oxidação dos ácidos graxos é convertida nos corpos cetônicos acetoacetato e β-hidroxiacetato, que são então liberados para a corrente sanguínea e servem como fonte de energia principalmente para o tecido muscular e os rins. Outra vantagem da produção hepática dos corpos cetônicos é que, em situações de grande deficiência de energia, a concentração sanguínea de corpos cetônicos torna-se bastante elevada permitindo que entrem no cérebro em quantidade alta, onde passam então a ser oxidados, reduzindo a quantidade de glicose requerida pelo cérebro. Os corpos cetônicos também diminuem a necessidade de se utilizar os aminoácidos das proteínas musculares como fonte de carbono para a produção de glicose (gliconeogênese) pelo fígado, necessária para que a glicemia seja mantida em tais situações (Marks *et al*, 1996).

I. 2. 1. 1. β-Oxidação de ácidos graxos

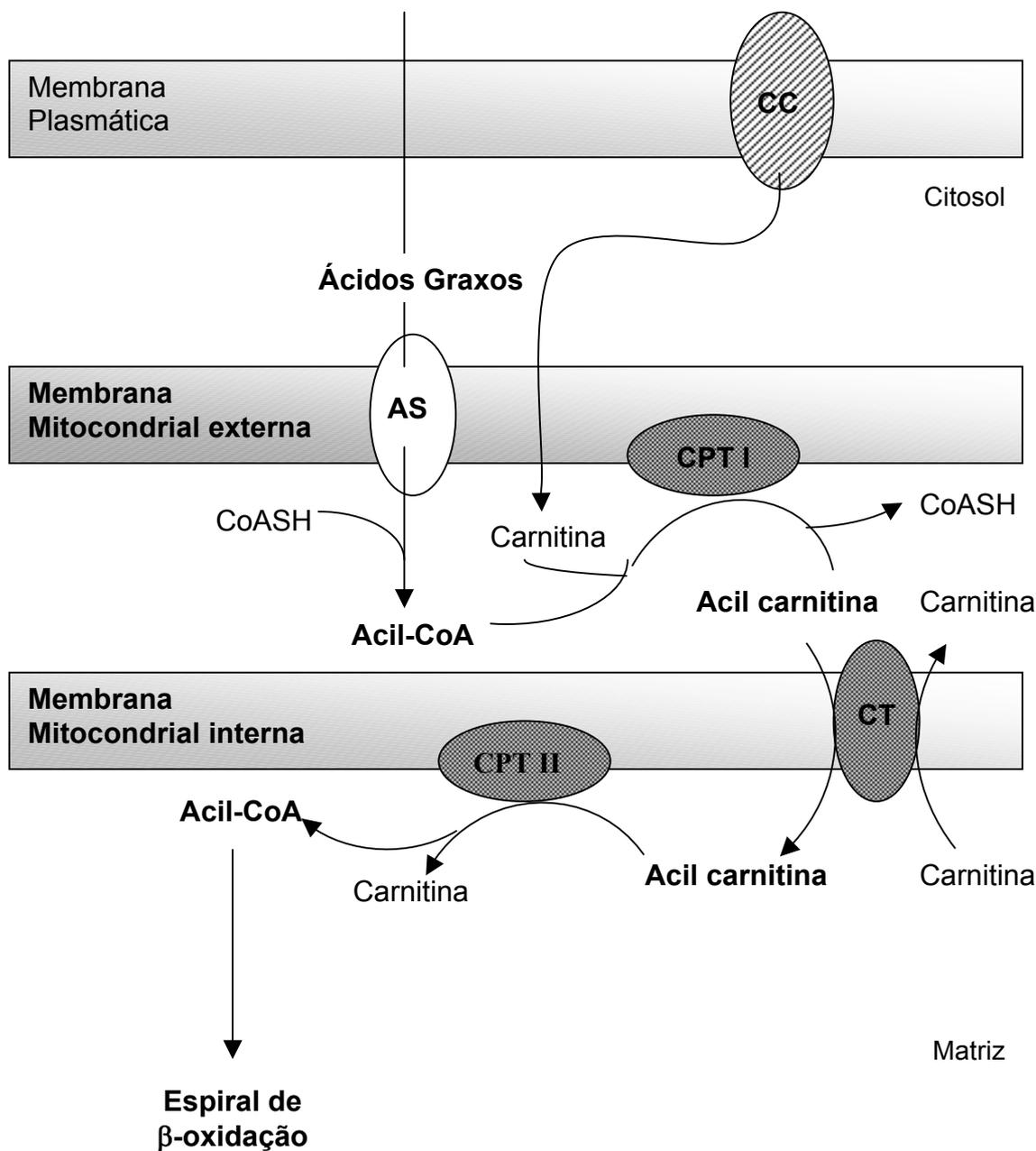
Os ácidos graxos deixam os adipócitos e vão para a circulação ligados à albumina até sua entrada no fígado e em outros órgãos, onde, dentro das mitocôndrias, sofrerão β-oxidação originando acetil-CoA. Antes da β-oxidação, os ácidos graxos são ativados através de uma acil-CoA sintetase que utiliza ATP para formar acil AMP graxo e pirofosfato [Figura I.2. – (a)]. O AMP é trocado por CoA e forma-se acil-CoA ácido graxo [Figura I.2. – (b)] (Marks *et al*, 1996).

Figura I.2. Ativação de um ácido graxo. Adaptado de Stryer, 4ª ed. (1996).



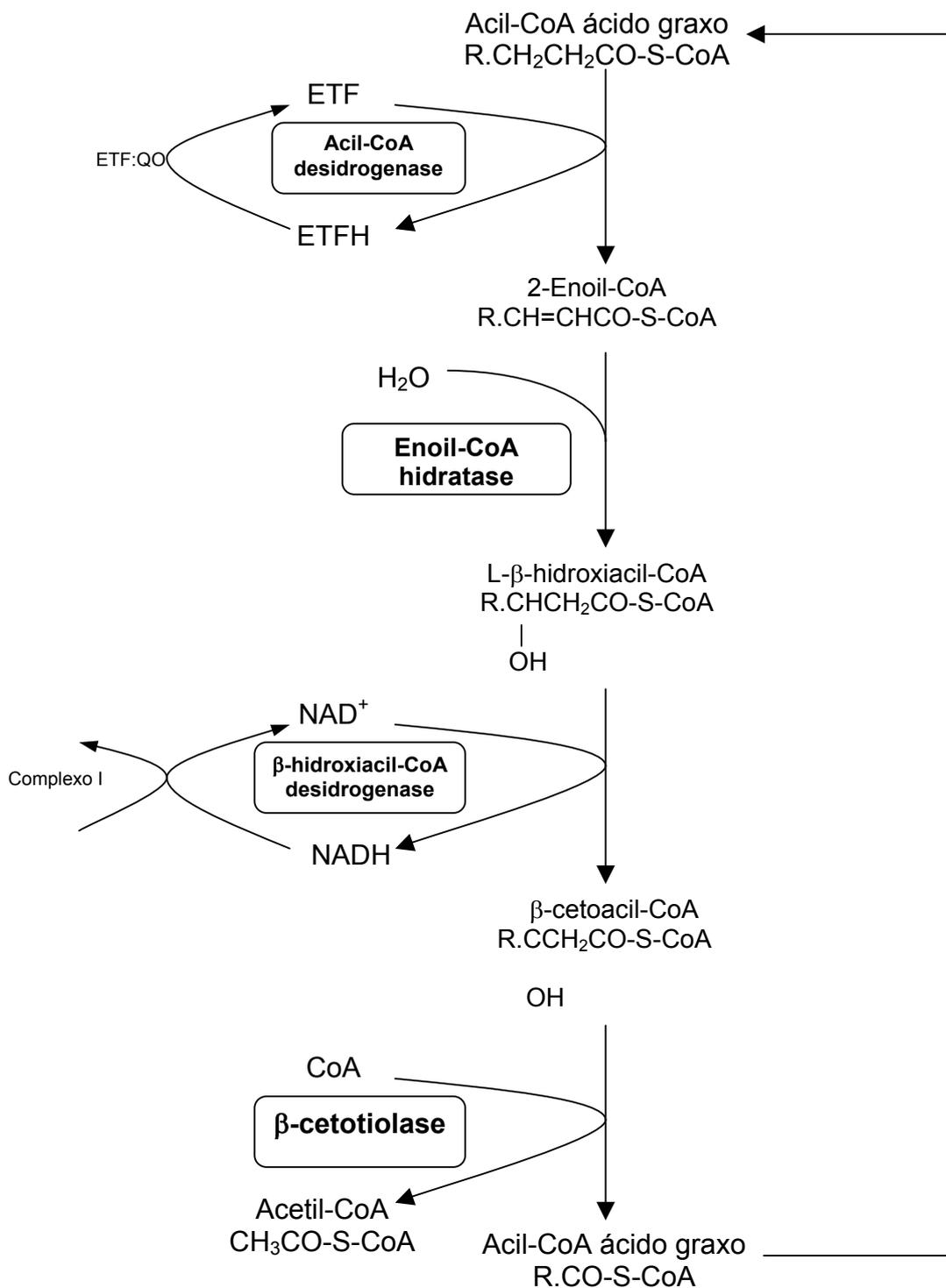
Entretanto, as acil-CoAs com cadeia de tamanho superior a 10 carbonos precisam conjugar-se à carnitina para serem transportadas para dentro da mitocôndria, e para isso são necessários: (a) um transportador de carnitina, para manter o suprimento intracelular de carnitina; (b) a enzima carnitina aciltransferase I (CPT I) na membrana mitocondrial externa, que converte acil-CoA em suas acilcarnitinas correspondentes; (c) uma translocase carnitina/acilcarnitina, que faz a transferência das acilcarnitinas e (d) a enzima carnitina aciltransferase II (CPT II) na matriz mitocondrial, que receberá novamente os ésteres de acil-CoA pela reesterificação das acilcarnitinas (Roe e Coates, 2001) (Figura I.3.).

Figura I.3. Ciclo da Carnitina. CC= captação de carnitina; AS=acil-CoA sintetase; CoASH= coenzima A; CPT= carnitina aciltransferase; CT= carnitina/acilcarnitina translocase, (adaptado de Roe e Coates, 2001)



Uma vez dentro da mitocôndria, as acil-CoAs sofrem a β -oxidação propriamente dita, que é composta por ciclos de quatro etapas (reações) consecutivas, cada uma chamada de espiral da β -oxidação (Figura I.4.).

Figura I.4. Espiral da β -oxidação mitocondrial. ETF= flavoproteína transferidora de elétrons; ETF:QO= ETF:ubiquinona oxidorredutase; ETFH= ETF reduzido (adaptado de Eaton *et al*, 1996)



Na primeira etapa, uma acil-CoA desidrogenase ligada ao nucleotídeo flavina adenina dinucleotídeo (FAD) retira 2 hidrogênios e seus elétrons do ácido graxo convertendo-o em enoil-CoA; o FAD(2H) gerado transfere seus elétrons para uma flavoproteína transferidora de elétrons (ETF) que os transfere à coenzima Q na cadeia transportadora de elétrons. Através da fosforilação oxidativa, a transferência de elétrons de cada FADH₂ é responsável pela produção de aproximadamente 2 ATPs, regenerando o FAD.

A segunda etapa é a hidratação da enoil-CoA catalisada pela enzima enoil-CoA hidratase, resultando na formação de L-β-hidroxiacil-CoA, que, em uma terceira etapa é oxidado a β-cetoacil-CoA pela β-hidroxi-acil-CoA desidrogenase em uma reação que envolve a redução de NAD⁺ a NADH. A oxidação de cada NADH na cadeia respiratória gera aproximadamente 3 ATPs. A quarta e última etapa envolve a clivagem da ligação entre os carbonos α e β do β-cetoacil-CoA, catalisada pela enzima β-cetotiolase, gerando os produtos de um ciclo completo da espiral da β-oxidação, que são uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de acil-Coa graxo cuja cadeia possui 2 carbonos a menos em relação à sua cadeia original. Esta operação (espiral) é repetida até que todos os carbonos do acil-CoA sejam convertidos em acetil-CoA.

Na realidade, existem diferentes acil-CoA desidrogenases que atuam em acil-CoA de número distinto de carbonos da cadeia do ácido graxo a ser oxidado. Desta maneira, existe uma enzima que catalisa a reação das acil-CoA de cadeia curta (4 e 6 carbonos) (SCAD), uma para as de cadeia média (4 a 12 carbonos) (MCAD), uma para as de cadeia longa (18 a 12 carbonos) (LCAD) e outra para os de cadeia muito longa (>20 a 24

carbonos) (VLCAD), cujas especificidades muitas vezes são sobrepostas conforme o comprimento da cadeia dos substratos.

Os ácidos graxos contendo cadeia de número ímpar de carbonos são convertidos na última etapa da β -oxidação em acetil-CoA e propionil-CoA, o último sendo carboxilado e mais tarde convertido a succinil-CoA, que tanto pode servir de substrato para o ciclo de Krebs, como também formar malato, um possível precursor de glicose através da gliconeogênese.

Para a β -oxidação dos ácidos graxos insaturados, entretanto, são necessárias duas enzimas adicionais, uma isomerase, que transfere as ligações duplas até ficarem entre os carbonos α e β (ou 2 e 4) e em configuração trans e uma redutase, que reduz o composto insaturado às custas da oxidação do NADPH a NADP⁺, eliminando a ligação dupla e, desta maneira, as demais etapas da oxidação voltam a ocorrer normalmente.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa (20 a 26 carbonos) são oxidados nos peroxissomos através de um processo que não produz ATP, mas que resulta na produção de octanoil-CoA, substância passível de ser β -oxidada na mitocôndria. Neste caso, além de gerar ATP, via transferência de elétrons para o FAD, também resulta na produção de acetil-CoA. Tal processo de oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa produz peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sendo, portanto, uma possível fonte geradora de radicais livres. Por isso está presente nos peroxissomos a enzima catalase, responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Outro processo envolvido na degradação de ácidos graxos de cadeia muito longa é a α -oxidação, que ocorre preponderantemente no cérebro, através do qual o ácido graxo perde um carbono por vez e em seguida passa a ser oxidado por β -oxidação (Marks *et al*, 1996).

I. 2. 2. Defeitos hereditários do metabolismo de ácidos graxos

No decurso dos últimos vinte anos, um número crescente de desordens metabólicas dos ácidos graxos tem sido identificado, constituindo-se em um grupo importante das acidúrias orgânicas chamado de defeitos do metabolismo de ácidos graxos (Tabela I.5.). O defeito molecular está na deficiência ou disfunção em uma ou mais enzimas ou proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos e nos processos de β -oxidação (Roe e Coates, 2001). As desordens mitocondriais de β -oxidação de ácidos graxos compartilham uma série de sinais e sintomas incluindo início de apresentação precoce, hipoglicemia hipocetótica, síndrome de Reye e envolvimento de múltiplos órgãos, com o desenvolvimento de fígado gorduroso (esteatose), cardiomiopatia dilatada ou hipertrófica e miopatia. Frequentemente, observa-se nesses pacientes coma e morte súbita de causa desconhecida nos primeiros dois anos de vida (Brackett *et al*, 1995). Como consequência de um defeito na oxidação de ácidos graxos, há acúmulo intracelular de ácidos graxos e derivados deles, incluindo intermediários graxos de acil-CoA. O tipo de ésteres de acil-CoA que se acumulam depende sobretudo da natureza da enzima bloqueada (Jackson *et al*, 1992; Pourfarzam *et al*, 1994).

Tabela I.5. Apresentação clínica dos defeitos de oxidação dos ácidos graxos.

Doença	Hipoglicemia Jejum	Cetose	Hepatopatia	Miopatia	Cardiomiopatia	Morte súbita
a) Deficiências de enzimas da matriz mitocondrial						
MCAD	+	±	+	-	-	+++
SCAD	+	+	+	+++	-	+
SCHAD (fígado)	+	+	+	±	-	+++
SCHAD (músculo)	+	+	-	+	+	-
MCKAT	+	±	+	+++	+	+
2,4-dienoil-redutase	-	-	-	+++	-	-
HMG-CoA sintase	+++	-	+	-	-	-
HMG-CoA liase	+++	-	+	+	+	-
α-ETF (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
β-ETF (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
Forma responsiva à tiamina (Acidúria glutárica II)	+	-	-	+	-	-
b) Defeito de proteínas ligadas a membranas						
<i>b.1) Membranas mitocondriais</i>						
CPT-I (fígado)	+	-	+++	+	-	+
Translocase	+	-	+++	+	+++	+
CPT-II (início neonatal)	+	-	+	+	+++	+
CPTII (início tardio)	-	-	-	+++	-	-
VLCAD	+	-	+	+	+++	+++
ETF-QO (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
LCHAD Isolada	+	-	+++	+	+++	+
α-TFP	+	-	+++	+	+++	+
β-TFP	+	-	+++	+	+++	+
b.2) Membrana plasmática						
Transporte de carnitina	+	-	+	+	+++	+
Transporte de ácidos graxos de cadeia longa	+	-	+++	-	-	-

- = não é manifestação comum; ± = manifestação ocasional; + = manifestação comum; +++ = manifestação freqüente; CoA = coenzima A; MCAD = desidrogenase de acil-coA de cadeia média ; SCAD = desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta ; SCHAD = desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia curta; MCKAT = 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia média ; HMG = 3-hidroxi-3-metilglutaril ; CPT-I = carnitina palmitiltransferase I; CPT-II = carnitina palmitiltransferase II ; VLCAD = desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa; ETF = flavoproteína transferidora de elétrons. , LCHAD = desidrogenase de hidroxiacil-CoA de cadeia longa, TFP= proteína trifuncional

Acredita-se que a prevalência dessas doenças seja subestimada, visto que o diagnóstico delas depende da detecção de metabólitos por métodos sofisticados e equipamentos de alto custo que poucos laboratórios possuem. Além disso, frequentemente esses metabólitos só aparecem em situações de descompensação metabólica. A tabela I.6. resume os principais achados clínicos laboratoriais, bem como a investigação diagnóstica e terapia dos defeitos de β -oxidação mitocondrial.

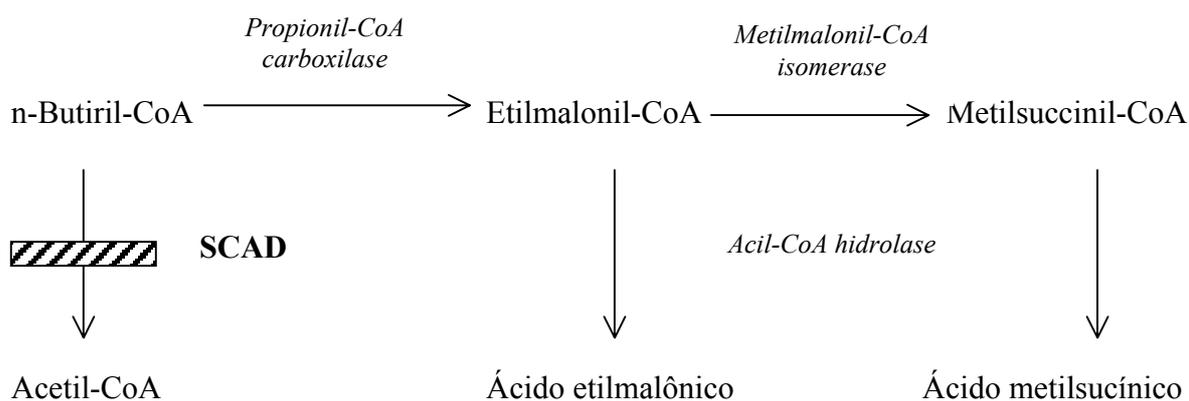
Tabela I.6. Achados clínicos nos defeitos de β -oxidação mitocondrial (Vockley e Whiteman, 2002).

<i>Sintomas sugestivos</i>	Síndrome de Reye (especialmente recorrente) Hipotonia e/ou miopatia Neuropatia periférica Níveis alterados de consciência Morte súbita inexplicada
<i>Achados sugestivos</i>	Hipoglicemia hipocetótica Cardiomiopatia Arritmia cardíaca Acidose metabólica inexplicada \pm hiperamonemia Falha hepática aguda na gestação Enzimas hepáticas elevadas, hipertensão e baixo número de plaquetas Rabdomiólise recorrente Acidúria dicarboxílica Deficiência de carnitina Falha hepática recorrente/fulminante
<i>Avaliação laboratorial inicial</i>	Sangue Glicose Ácidos graxos livres pH Amônia Carnitina Creatina quinase Testes para função hepática Lactato/piruvato Eletrólitos
<i>Testes metabólicos especializados</i>	Ácidos orgânicos urinários/acilglicinas Perfil plasmático de acilcarnitinas Perfil de ácidos graxos livres Estudos de oxidação em fibroblastos Estudos de fibroblastos em fluxo Análise de enzimas específicas Testes de provocação
<i>Terapias possíveis</i>	Dieta com baixo teor de gordura (25%) Suplemento com triglicerídios de cadeia média (não para deficiência de MCAD) Ingesta calórica alta (de carboidratos) Alimentos por sonda nasogástrica durante a noite Amido de milho na hora de dormir Carnitina somente para defeito de transportador

I. 2. 2. 1. Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD)

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta é um erro inato do metabolismo potencialmente letal que afeta o último ciclo da oxidação dos ácidos graxos (Bhala *et al*, 1995). Nessa doença, ocorre acúmulo mitocondrial de butiril-CoA, que é o substrato da enzima responsável pela doença. Quando uma grande quantidade de butiril-CoA se acumula na matriz, a carboxilação de butiril-CoA a etilmalonil-CoA pela propionil-CoA carboxilase ocorre, sendo a etilmalonil-CoA hidrolisada a ácido etilmalônico livre ou isomerizada pela metilmalonil-CoA isomerase ao composto metilsuccinil-CoA, o qual é hidrolisado a ácido metilsucínico. (Corydon *et al*, 1996; Sewell *et al*, 1993; Tein *et al*, 1999). A figura I.5. mostra a formação desses metabólitos. Assim, o ácido etilmalônico, bem como o ácido metilsucínico, acumulam-se nos tecidos dos pacientes afetados pelo distúrbio.

Figura I.5. Formação de metabólitos na deficiência da SCAD originada pelo aumento do metabolismo alternativo de n-butilil-CoA (Sewell *et al*, 1993).



I. 2. 2. 1. 1. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas mais comuns associadas com distúrbios do transporte e oxidação mitocondrial de ácidos graxos incluem hipoglicemia hipocetótica, graus variados de doença hepática, miopatia, cardiomiopatia hipertrófica e morte súbita no início da vida. Os sinais e sintomas dessa doença são variáveis, podendo aparecer em qualquer idade, do nascimento à vida adulta, e em combinações variáveis, freqüentemente levando a episódios ameaçadores à vida de descompensação metabólica depois de um período de ingestão inadequada de calorias e/ou doença intercorrente (Rinaldo *et al*, 2001).

Os achados clínicos encontrados nos pacientes descritos com deficiência de SCAD incluem episódios de acidose metabólica intermitente, hiperamonemia, coma e acidose neonatal com hiperreflexia, miopatia por depósito de lipídios e hipotonia. A hipoglicemia não é usual nessa desordem. Os metabólitos característicos acumulados são os ácidos etilmalônico e metilsucínico. Subseqüentemente, foi demonstrado que a presença de uma das duas variantes comuns de SCAD 625 G>A e 511 C >T predispõe à excessiva produção de ácido etilmalônico. O espectro clínico dessa deficiência e a relevância clínica dos polimorfismos comuns permanecem a serem definidos, assim como muitos dos pacientes previamente descritos com SCAD podem ter tido somente presença coincidente de um ou ambos dos polimorfismos comuns sem uma conexão causal (Vockley e Whiteman, 2002).

I. 2. 2. 1. 2. Patogênese

Os mecanismos etiopatogênicos responsáveis pelas manifestações clínicas das distúrbios do transporte de ácidos graxos e da oxidação mitocondrial são similares a todos os erros inatos do metabolismo mitocondrial, originando-se de dois mecanismos básicos: intoxicação e deficiência energética. Em relação à intoxicação, o acúmulo de substrato leva

diretamente à toxicidade e à inibição de outras enzimas. Na deficiência energética, o acúmulo de substrato seria relativamente inofensivo, mas a disponibilidade limitada da reação produz prejuízo essencial significativo às funções celulares. Nas desordens do transporte de ácidos graxos e da oxidação mitocondrial ambos mecanismos estão envolvidos: o acúmulo de espécies acil-CoA, seus metabólitos secundários e outros produtos refletem o componente intoxicação; a falta de acetil-CoA e equivalentes reduzidos prejudica a cetogênese hepática e a síntese de ATP pela via da fosforilação oxidativa e resulta em depleção energética celular (Rinaldo, 2001).

A patogênese da doença associada com a deficiência de SCAD não apresenta uma linha comum entre os pacientes relatados com esse defeito. Alguns deles parecem ter deficiência de SCAD isolada no músculo, manifestando-a tanto na infância quanto na vida adulta, enquanto outros têm um defeito enzimático expresso em fibroblastos (Roe e Coates, 2001).

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar a patogênese dos sintomas clínicos nesta desordem. Acredita-se que a hipoglicemia seja devido à utilização aumentada de glicose pela deficiência energética secundária ao déficit de oxidação de ácidos graxos. A perda de carnitina tecidual devido à excreção de acilcarnitinas pode prejudicar a oxidação de ácidos graxos. A fraqueza muscular pode ser devida à depleção de carnitina, a uma falha parcial da cetogênese devido a menor oxidação de ácidos graxos ou a dano muscular secundário ao acúmulo de gordura. A causa da doença hepática é desconhecida e pode ser relacionada ao acúmulo excessivo de gordura ou às acil-CoAs de ácido graxo intramitocondriais prejudicando a função mitocondrial (Elias *et al*, 1997).

I. 2. 2. 1. 3. Diagnóstico

Pacientes com deficiência de SCAD excretam ácidos orgânicos de cadeia curta (etilmalônico, metilsucínico), butirilglicina e butirilcarnitina na urina (Roe e Coates, 2001). Quando se considera a possibilidade de uma desordem mitocondrial de oxidação de gordura, uma rotina segura e testes especializados devem ser realizados. As metodologias utilizadas para detectar esses metabólitos incluem análise quantitativa de ácidos orgânicos urinários e acilglicinas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), bem como a quantificação de acilcarnitinas por espectrometria de massa em tandem. A cultura de fibroblastos realizada a partir de biópsia de pele é utilizada para a realização dos ensaios enzimáticos, onde é medida a atividade da enzima específica (Bhala *et al*, 1995). A tabela I.7. mostra a rotina laboratorial especializada para a investigação de pacientes com possível desordem de transporte de ácidos graxos ou de oxidação mitocondrial.

Tabela I.7. Investigação utilizada na avaliação de pacientes com uma possível desordem do transporte de ácidos graxos e de oxidação mitocondrial (Rinaldo, 2001).

Sangue	Urina
<i>Investigação usual</i>	
Gases, eletrólitos	Corpos cetônicos (3-ceto-ácidos)
Glicose, amônia, ácido úrico	
Ácido láctico / ácido pirúvico (relação)	
Corpos cetônicos (3OHB/AcAc)	
<i>Investigação especializada</i>	
Carnitina	Ácidos orgânicos
Acilcarnitinas	Acilglicinas
Ácidos graxos C ₈ -C ₁₈	
Ácidos graxos 3-hidróxi C ₈ -C ₁₈	

Em algumas ocasiões a criança afetada morre sem definição do diagnóstico da doença. Nestes casos, é essencial coletar amostras *postmortem* para o esclarecimento diagnóstico e posterior aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.

I. 2. 2. 1. 4. Tratamento

As medidas terapêuticas para o manejo clínico da deficiência da SCAD podem dividir-se em dietéticas, farmacológicas e sintomáticas. Uma vez diagnosticada a doença, é fundamental prover ao paciente glicose suficiente para prevenir a lipólise do tecido adiposo, sendo primordial no período neonatal e nas descompensações metabólicas.

A base do tratamento dietético consistirá em prevenir os períodos de jejum e restringir a ingesta de gorduras, com suplementação extra de carboidratos. É importante evitar o jejum (não excedendo 8 horas segundo a tolerância individual) e assegurar a ingesta suficiente de calorias durante os períodos de estresse metabólico, para evitar, dentro do possível, o uso de ácidos graxos como fonte de energia.

Deve-se alertar aos pais para a necessidade de utilizar soluções glicosadas orais durante episódios de vômitos, febre ou recusa alimentar (Tabela I.8.). Deve-se recorrer ao hospital caso essas medidas sejam insuficientes (Quintana e Crespo, 2001).

Tabela I.8. Tratamento dos defeitos hereditários da β -oxidação (Adaptado de Quintana e Crespo, 2001).

Medida principal: evitar jejum prolongado
Fase 1: Início do episódio
Aumentar a quantidade e a frequência da ingesta de carboidratos: frutas, massas, arroz, pão
Fase 2: Início da intolerância alimentar
Administrar bebidas com carboidratos: soluções glicosadas, água açucarada
Fase 3: Intolerância à alimentação
Internação hospitalar: iniciar tratamento com glicose i.v.

I. 2. 2. 1. 5. Modelo animal da deficiência da SCAD

Modelos animais de erros inatos do metabolismo são ferramentas valiosas para a investigação da patogênese do dano tecidual e de possíveis estratégias terapêuticas. Em 1989, Wood e colaboradores descobriram e caracterizaram um modelo de camundongo com ausência completa de atividade da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (BALB/cByJ). A deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta no modelo animal em camundongo é devido a uma deleção 278-bp no gene SCAD resultando em uma mutação antígeno negativa. Este rato mutante desenvolve uma acidúria orgânica profunda, fígado gorduroso e torna-se hipoglicêmico. Além disso, ocorre presença marcada de butirilglicina e dos ácidos etilmalônico e metilsucínico na urina, da mesma forma que ocorre em pacientes humanos. Este modelo, portanto, oferece uma excelente oportunidade para estudar a patogênese *in vivo* da deficiência da SCAD em nível bioquímico e molecular.

I. 3. O Sistema Glutamatérgico

Os aminoácidos glutamato e aspartato são os principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. O glutamato está envolvido em diversas funções cerebrais tais como cognição, aprendizado e memória e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Collingridge e Lester, 1989, Izquierdo *et al*, 1994; Ozawa *et al*, 1998). Responsável por respostas excitatórias pós-sinápticas em diversas regiões cerebrais, o glutamato também produz alterações de longa duração (LTP), na transmissão sináptica em neurônios do hipocampo e do córtex visual e na depressão de longa duração (LTD) no cerebelo e córtex visual (Artola e Singer, 1987; Ito, 1989). Entretanto, a excessiva ativação de receptores glutamatérgicos pode causar injúria ou

morte neuronal. Olney e colaboradores (1980) denominaram essa condição de excitotoxicidade. Tem sido demonstrada a participação de mecanismos excitotóxicos em uma variedade de patologias e desordens neurodegenerativas, tais como epilepsia, encefalopatias isquêmicas, doença de Alzheimer, enfermidade de Huntington e hipóxia (Olney *et al*, 1990; Watkins *et al*, 1990; Lipton e Rosenberg, 1994; Michaelis *et al*, 1998).

I. 3. 1. Biossíntese de glutamato

O glutamato é encontrado em altas concentrações no SNC. Dois processos são responsáveis pela síntese de glutamato no terminal nervoso. O glutamato pode ser sintetizado a partir de intermediários do metabolismo da glicose, da cadeia carbonada de outros aminoácidos e de intermediários do ciclo de Krebs por transaminação. Além dessas fontes, o glutamato pode ser formado diretamente a partir da glutamina, através do ciclo glutamato-glutamina. Uma vez sintetizado, o glutamato é armazenado em altas concentrações (100 mM) em vesículas que se encontram no terminal pré-sináptico.

I. 3. 1. 1. Ciclo glutamato-glutamina

O ciclo glutamato-glutamina é central no entendimento do metabolismo cerebral do glutamato. O ciclo se inicia com a liberação de glutamato pré-sináptico na fenda, um processo que depende da entrada de cálcio, que envolve a fusão de vesículas pré-sinápticas contendo glutamato com a membrana neuronal (Fillenz, 1995).

A concentração do glutamato na fenda sináptica é de 2-5 μM . Todavia, este valor pode alcançar 50 a 100 μM após a despolarização neuronal (Daiklin e Yudkoff, 2000).

O glutamato presente na fenda sináptica deve ser removido rapidamente a fim de evitar um processo excitotóxico. Há três possibilidades para tal: 1) captação no

compartimento pós-sináptico; 2) recaptção para o compartimento pré-sináptico (mostrado ser menos significativo nos últimos anos); 3) captação pela glia – compartimento não neuronal – mais precisamente pelo astrócitos. Este último é o mecanismo mais importante para a remoção do glutamato da fenda (Danbolt, 1994; Gegelashvili e Schousboe, 1998; Takahashi *et al*, 1997; Danboldt, 2001). Uma possível explicação para isso é o fato de o potencial de membrana dos astrócitos ser mais baixo do que o de neurônios (Erecinska e Silver, 1990) favorecendo uma eficiente captação de glutamato via um mecanismo sódio-dependente.

Dentro dos astrócitos, o glutamato pode seguir a via que o exporta para os capilares sangüíneos (Brightman e Cheng-Tao, 1988). A desvantagem desta via é que ela resulta em uma perda líquida de carbono e nitrogênio do sistema. Também pode entrar no Ciclo de Krebs através de seu α -cetoácido (α -cetoglutarato) para servir como fonte de energia. Alternativamente, o glutamato pode ser convertido em um outro composto não neuroativo, que permita seu tráfego através do fluido extracelular sem causar uma despolarização neuronal. O glutamato captado pelos astrócitos é desta forma convertido a glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase (GS).



Como a reação catalisada pela GS envolve amidação do glutamato, a captação deste do meio extracelular é um evento importante para detoxificação da amônia, podendo a inibição da GS produzir convulsões generalizadas por excesso de amônia (Cooper e Plum, 1987).

A amônia consumida para gerar glutamina pode ser derivada tanto do sangue (Cooper *et al*, 1979) como do metabolismo cerebral.

Os níveis de glutamina podem aumentar abruptamente em estados hiperamonêmicos, levando ao edema da glia (Takahashi *et al*, 1991). Alguns autores sugerem que o aumento da glutamina elevaria a osmolaridade intracelular e conseqüentemente geraria um influxo de água (Brusilow e Traystman, 1986).

Na glia, a entrada do glutamato captado na via oxidativa (via transaminação) ou na via de síntese de glutamina dependerá da concentração do glutamato externo. Logo, em baixas concentrações externas de glutamato, a via da glutamina sintetase é favorecida, mas quando estas concentrações estão elevadas, o processo oxidativo é favorecido, com quantidades consideráveis de glutamato sendo consumido (Mckenna *et al*, 1996).

A glutamina é captada tanto via mecanismo sódio-dependente como via sódio independente (Yudkoff *et al*, 1989). Durante a despolarização, quando a concentração interna de ATP diminui, a captação de glutamina nos terminais nervosos é aumentada (Erecinska *et al*, 1990).

O destino predominante da glutamina recaptada pelos neurônios é sua hidrólise a glutamato e amônia pela ação da enzima mitocondrial glutaminase, que é dependente de fosfato. Conforme relatam Erecinska e colegas (1988, 1990), o glutamato derivado da glutamina não é todo utilizado para repor o *pool* do neurotransmissor. Uma parte deste glutamato pode ser oxidada nos terminais nervosos por transaminação para α -cetogluturato, via aspartato aminotransferase, e este substrato entrar no ciclo do ácido tricarboxílico. Desta forma, além de um simples precursor do glutamato neuronal, a glutamina é um potencial combustível que, como a glicose, suporta o requerimento energético cerebral.

I. 3. 2. Glutamato e seus receptores

O glutamato possui diversas funções provavelmente refletidas na existência de uma variedade de receptores classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais.

Os receptores glutamatérgicos estão categorizados em duas classes distintas: receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Hollmann e Heinemann, 1994; Conn e Pin, 1997; Ozawa *et al*, 1998). Os receptores ionotrópicos (iGluR) são assim denominados pois são canais que permitem a passagem de um cátion específico quando ativados por um agonista (Mori e Mishima, 1995; Ozawa *et al*, 1998) e os receptores metabotrópicos pertencem a uma família de receptores que estão acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), promovendo então a modulação de efetores intracelulares que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução do sinal celular (Conn e Pin, 1997; Ozawa *et al*, 1998).

I. 3. 2. 1. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR)

Os receptores glutamatérgicos do tipo iGluR posteriormente foram divididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido cáinico (KA), de acordo com a sensibilidade a estes agonistas. Os receptores mGluR podem ser ativados por uma infinidade de agonistas subdivididos em três grupos de acordo com a semelhança na sua seqüência de aminoácidos (Pin e Duvoisin, 1995), sistema de transdução de sinal e farmacologia. A aplicação da tecnologia de clonagem molecular possibilitou a clonagem de subtipos de receptores glutamatérgicos. Após a clonagem do primeiro receptor ionotrópico (Hollmann *et al*, 1989) e metabotrópico

(Houamed *et al*, 1991; Masu *et al*, 1991), outros receptores foram clonados e então subdivididos.

Os receptores iGluR do tipo NMDA estão distribuídos em todo o cérebro (Monaghan *et al*, 1989) e apresentam algumas propriedades importantes tais como: a) a abertura dos canais iônicos requer a ocupação do sítio de união de NMDA/glutamato por um agonista e do sítio de união para glicina que age como um co-agonista, da liberação via despolarização (dependente de voltagem) e do bloqueio do canal iônico pelo íon magnésio; b) a sua ativação resulta em alta permeabilidade aos íons cálcio; c) são ativados por concentrações baixas de glutamato; d) o tempo de abertura dos canais é prolongado; e e) possuem mecanismos modulatórios múltiplos (glicina, zinco, poliaminas, etc.).

Os receptores iGluR do tipo AMPA e cainato (KA) são responsáveis pela ativação rápida da neurotransmissão excitatória no SNC. Inicialmente, os receptores AMPA eram denominados receptores quisqualato. Entretanto, como quisqualato também estimula mGluRs, esta denominação foi abandonada. Os canais associados aos receptores AMPA respondem rapidamente à presença de agonistas (Patneau *et al*, 1994). Esses canais são permeáveis aos íons sódio e potássio (Jahr e Stevens, 1987). Os sítios de união para receptores AMPA estão amplamente distribuídos no SNC, porém mais localizados no hipocampo, giro denteado e no cerebelo (Monaghan e Cotman, 1982). O ácido caínico é um potente agonista de receptores AMPA, ativando também e principalmente os receptores KA. Uma família de receptores KA foi clonada e observou-se que algumas subunidades têm mais afinidade pelo receptor AMPA (GluR5, GluR6, GluR7) enquanto outras duas subunidades (KA1 e KA2) têm sítios de alta afinidade por receptores cainato (Seeburg, 1993; Hollmann e Heinemann, 1994; Bettler e Mülle, 1995; Ozawa *et al*, 1998). A distribuição cerebral dos receptores do tipo KA ocorre principalmente na região CA3 e no

giro denteado do hipocampo. Entretanto, os sítios receptores para KA encontram-se altamente expressos no cérebro de aves, anfíbios e peixes (Evans *et al*, 1979), principalmente em cerebelo de pintos (Ramos *et al*, 1997). Subunidades dos receptores AMPA e KA podem coexistir nos mesmos neurônios (Mackler e Eberwine, 1993), sem estarem associados (Wenthold *et al*, 1994).

O primeiro receptor glutamatérgico metabotrópico foi clonado independentemente por dois grupos de pesquisadores (Masu *et al*, 1991; Houamed *et al*, 1991). Atualmente, oito subtipos de receptores metabotrópicos já foram clonados - mGluR1-mGluR8 (Duvoisin *et al*, 1995; Saugstad *et al*, 1997; Ozawa *et al*, 1998). Estes subtipos estão intimamente relacionados com sua estrutura primária e foram classificados em três grupos, baseados na homologia da seqüência de seus aminoácidos, farmacologia e sistema de transdução: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8). Vários agonistas e antagonistas metabotrópicos têm sido caracterizados e sua ordem de potência é variável.

Quanto aos mecanismos de transdução do sinal por receptores metabotrópicos, a ativação dos receptores do grupo I estimula a fosfolipase C (PLC) e subsequentemente leva à formação de diacilglicerol, que estimula a proteína quinase C, e inositol fosfato (IP3), com a consequente liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Masu *et al*, 1991; Aramori e Nakanishi, 1992). Por outro lado, os subtipos dos grupos II e III estão acoplados à inibição da adenilato ciclase. Os subtipos do grupo II inibem mais pronunciadamente a formação de AMPc induzida por forskolina (Tanabe *et al*, 1992, 1993) do que os subtipos do grupo III. A ativação dos receptores metabotrópicos que estão localizados em terminais pré- ou pós-sinápticos pode promover efeitos inibitórios ou excitatórios, que podem ser exercidos em terminais pré- ou pós-sinápticos.

I. 3. 3. Transportadores de glutamato

Os transportadores de glutamato são expressos por muitos tipos celulares no SNC, incluindo astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais (Kanai e Hediger, 1992; Rothstein *et al*, 1994; Kondo *et al*, 1995; Domercq e Mamute, 1999). Dentre estes, a captação mediada pelos astrócitos é quantitativamente a mais importante para manter as concentrações extracelulares de glutamato normais.

Os sistemas de captação podem ser de baixa ou alta afinidade ao substrato. A captação de alta afinidade ao glutamato é sódio dependente e é mediada por proteína transportadora localizada tanto em membrana plasmática de glia (Danboldt *et al*, 1994; Levy *et al*, 1993a) como em neurônios liberando glutamato como neurotransmissor (Gundersen *et al*, 1993; Nakamura *et al*, 1993).

A captação de baixa afinidade de glutamato exhibe valores de Km acima de 500 μM (Johnston, 1981) e é descrita como sódio-independente. Este sistema de captação tem sido sugerido como responsável por suprir as células cerebrais com aminoácidos para fins metabólicos ou ainda para ajudar a reduzir o pico da concentração de glutamato na fenda sináptica, já que sua $V_{\text{máx}}$ é maior do que a da captação de alta afinidade (Danboldt, 2001).

Além dos sistemas de captação mencionados, há um terceiro sistema de alta afinidade, dependente de cloreto e independente de sódio, que tem sido descrito em estudos com tecido cerebral e cultivo celular (Balcar e Li, 1992). Este transportador é encontrado em fibroblastos, macrófagos, células gliais, endoteliais e hepatócitos. Ele funciona como um trocador de cisteína-glutamato, carregando cisteína para dentro da célula e transportando glutamato para o meio extracelular (Bannai, 1986). Desde que a função fisiológica deste transportador é captar cisteína às custas da liberação de glutamato,

é mais apropriado referir-se a ele como um carreador de cisteína sensível a glutamato do que um transportador de glutamato propriamente dito.

A captação de cisteína é competitivamente inibida por altas concentrações de glutamato externo e nestas situações pode haver morte neuronal devido ao estresse oxidativo, já que a cisteína é requerida para a síntese de glutathione (antioxidante endógeno que participa da remoção de peróxidos) (Murphy *et al*, 1989; Cho e Bannai, 1990).

A partir de estudos de clonagem molecular, cinco subtipos de transportadores de glutamato Na^+ -dependentes, estruturalmente distintos, têm sido identificados e caracterizados: GLT1, GLAST, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 (Sims e Robinson, 1999) (Tabela I.9.).

Tabela I.9. Família dos transportadores de glutamato

Células gliais	GLAST/EAAT1	Células de Muller (retina)
		Células de Bergmann (cerebelo)
	GLT1/EAAT2	Astrócitos em todo o cérebro
Células neuronais	EAAC1/EAAT3	Somata e dendritos neuronais
	EAAT4	Células de Purkinje (cerebelo)
	EAAT5	Células bipolares e fotorreceptoras retiniais

*Fonte: Attwell, 2000.

O transporte de glutamato pelos seus transportadores parece ser termodinamicamente acoplado ao co-transporte de pelo menos dois íons sódio, um próton e o transporte contrário de um íon potássio, gerando a entrada líquida na célula de uma carga positiva por glutamato transportado (Barbour *et al*, 1988; Zerangue e Kavanaugh, 1996).

Wadiche e colegas (1995^a) constataram que a carga líquida que move-se com a entrada de glutamato é maior do que aquela prevista pela estequiometria descrita. Esta entrada extra elicitada surge de um fluxo de íons cloreto não acoplados termodinamicamente e vários estudos sugerem que a condutância deste canal iônico pode ser ativada independentemente do transporte do glutamato (Billups *et al*, 1996; Spiridon *et al*, 1998).

Embora estes dados suportam o fato dos transportadores de glutamato neuronal funcionarem tanto como transportador quanto como um canal de cloreto, nenhuma evidência estrutural sugere se o glutamato e o cloreto permeiam o mesmo poro ou atravessam a membrana por diferentes vias da proteína transportadora (Tanaka, 2000).

Uma vez dentro da célula, o glutamato sofre uma redistribuição, podendo ser captado pela mitocôndria através de um sistema antiporte glutamato/OH⁻ (que equivale a um simporte glutamato/H⁺) (Dennis *et al*, 1976) ou através de um trocador glutamato/aspartato (Kramer e Palmieri, 1989). A maioria das enzimas que degrada glutamato se localiza na mitocôndria.

Por outro lado, o glutamato presente nos terminais nervosos pode ser captado pelas vesículas sinápticas através de um transportador que é muito diferente daqueles da membrana plasmática. A captação vesicular é independente de sódio e potássio, de baixa afinidade ao glutamato ($K_m \sim 1\text{mM}$), não interage com aspartato e requer baixas

concentrações de íons cloreto (Naito e Ueda, 1983; Fykse *et al*, 1992). O sítio de ligação é distinto do sítio de ligação ao substrato e regula a atividade do transporte.

A H⁺-ATPase vacuolar, localizada na membrana vesicular, bombeia próton para dentro da vesícula. O potencial de membrana positivo interno dirige o transportador de glutamato vesicular (Naito e Ueda, 1985; Moriyama *et al*, 1990; Tabb *et al*, 1992).

I. 4. Radicais Livres

I. 4. 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 (O₂^{•-}) onde um elétron não pareado é adicionado ao estado basal do O₂, os radicais hidroxila (OH[•]) peroxila (RO₂[•]), alkoxila, (RO[•]) e os derivados não radicais potencialmente oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ozônio (O₃), 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[•] 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).

I. 4. 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 al*, 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.10. demonstra alguns efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO[•]).

Tabela I.10. Efeitos fisiológicos e deletérios do óxido nítrico (NO^{*}).

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

Referência: Halliwell e Gutteridge, 1999.

I. 4. 3. Envolvimento de radicais livres em doenças neurodegenerativas

O cérebro é especialmente sensível ao estresse oxidativo e entre as razões para tal vulnerabilidade podemos citar os encontrados na tabela I.11.

Tabela I.11. Motivos que tornam o cérebro especialmente vulnerável ao estresse oxidativo.

- Alto transporte de Ca⁺⁺ através de membranas neuronais; qualquer alteração neste fluxo pode gerar estresse oxidativo.
- Presença de aminoácidos excitotóxicos, que podem gerar estresse oxidativo.
- Alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido.
- Muitos neurotransmissores são moléculas autooxidáveis.
- Várias áreas do cérebro contêm altas concentrações de ferro (por exemplo a substância nigra, o núcleo caudado, o putamen e o globus palidus).
- Ao contrário do plasma, o líquido não possui significativa capacidade de ligação a ferro livre.
- As membranas lipídicas neuronais contêm alta quantidade de ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada.
- O metabolismo cerebral normal gera peróxido de hidrogênio; um exemplo disso é a oxidação da dopamina pela monoaminaoxidase (MAO).
- O cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes.
- Algumas células gliais (microglia), como os macrófagos, podem produzir O₂^{*} e H₂O₂ quando ativados.

Fonte : Halliwell e Gutteridge, 1999.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido focada no papel exercido 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 e de Alzheimer (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell, 1994; Matés *et al*, 1999; Halliwell e Gutteridge, 1999). Recentemente, outras doenças que afetam o sistema nervoso central, como a epilepsia, foram relacionados com formação e danos causados por radicais livres (Dal-Pizzol *et al*, 2000b).

A doença de Parkinson é caracterizada clinicamente pelo surgimento de tremores rítmicos dos membros, normalmente em pessoas com mais de 50 anos. Como avanço da doença, os pacientes começam a ter dificuldade de deslocamento. A movimentação é lenta – bradicinesia – e o início do movimento também é lento – acinesia – levando a uma atrofia muscular. Evidências da existência de uma relação de estresse oxidativo e o desenvolvimento da doença inclui aumento de lipoperoxidação e do dano oxidativo ao DNA e proteínas, aumento no conteúdo de ferro na substância nigra de pacientes de doença de Parkinson que foram a óbito, quando comparados com pacientes sadios, e diminuição da quantidade de peptídeo glutatião reduzido (Halliwell e Gutteridge, 1999). Em doenças como o Alzheimer, assim como em doenças causadas por príons, a demência é decorrente de uma maciça morte neuronal mediada pela deposição de placas amilóides, causada pela modificação da conformação de uma proteína celular – a proteína precursora amilóide (APP) – gerando um produto rico em estrutura tipo folha β -antiparalela (β -AP), insolúvel e não passível de degradação (Kakinusa, 1998; Carrel e Gooptu, 1998). Assim como na doença de Parkinson, alguns trabalhos correlacionam a produção de radicais livres com a etiologia de Alzheimer (Schippling *et al*, 2000). Por induzir a agregação de

proteínas, as espécies reativas do oxigênio são fortes candidatas como causa da formação das fibras amilóides, sendo sua formação mediada por reações catalisadas por íons ferro e alumínio.

I. 4. 3. 1. Influência do estresse oxidativo na patogênese dos erros inatos do metabolismo

Recentemente foi demonstrado em nosso laboratório que os ácidos propiônico (PA) e metilmalônico (MA) induzem a geração de radicais livres em córtex cerebral de ratos *in vitro* (Fontella *et al*, 2000). Estimulação *in vitro* de superóxido por PA foi também observada em células sanguíneas (Nakao *et al*, 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 α -tocoferol estavam muito diminuídos em um paciente com essa doença (Moyano *et al*, 1997). Nesse particular, demonstramos recentemente que o ácido propiônico diminui as defesas antioxidantes em hipocampo de ratos cronicamente administrados com esse ácido e que a vitamina C (antioxidante) previne esse efeito (Pettenuzzo *et al*, 2002).

I. 4. 4. Agentes antioxidantes

I. 4. 4. 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 al*, 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 seqüestradores de radicais livres que previnem sua propagação
- II. Hidrólise enzimática de ésteres para remover ácidos graxos peroxidados
- III. Seqüestro 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 glutathiona (GSH), o α -tocoferol e os carotenóides, como o β -caroteno e o licopeno (Sies e Stahl, 1995). A tabela I.12. 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 glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase (Cassarino e Bennett Jr., 1999).

Tabela I.12. Antioxidantes não enzimáticos encontrados no plasma humano.

Antioxidante	Concentração no plasma $\mu\text{mol/L}$
<i>Hidrossolúveis</i>	
Ácido ascórbico	30-150
Glutathiona (GSH)	1-2
Ácido úrico	160-450
Bilirrubina	5-20
<i>Lipossolúveis</i>	
α -tocoferol	15-40
δ -tocoferol	3-5
α -caroteno	0,05-0,1
β -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

II. OBJETIVOS

II. 1. Geral

Estudar o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico e de estresse oxidativo em cérebro de ratos.

II. 2. Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de cérebro de ratos, na presença e/ou ausência de íons sódio.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a captação do L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.
- Avaliar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza p.a.

Os ácidos foram sempre diluídos no tampão de incubação específico para cada técnica, exceto nos experimentos de ligação de glutamato a membranas sinápticas e de captação de vesicular de glutamato, onde foram diluídos em água destilada (filtrada por milli-Q).

III. 1. 1. Reagentes utilizados e outros materiais de consumo

- Acetato de amônio – Merck
- Ácido acético – Merck
- Ácido caínico (KA)
- Ácido clorídrico – Merck
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) – Merck
- Ácido glutárico – Sigma
- Albumina bovina – Sigma
- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) - RBI
- 1S,3R-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato (trans-ACPD) - RBI
- 1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]benzeno (POPOP) – Sigma
- Cloreto de cálcio - Merck
- Cloreto de magnésio - Merck
- Cloreto de potássio - Merck
- Cloreto de sódio – Merck
- (2S, 2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciclopropil)glicina (DCGIV) – Tocris
- (S)-3,5-dihidróxifenilglicina (DHPG) – Tocris
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Synth
- Glicose – Nuclear

- HEPES – Sigma
- Hidróxido de potássio – Merck
- Hidróxido de sódio – Merck
- L-[³H] Ácido caínico – Amersham
- L-[³H] ácido glutâmico – Amersham
- L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) – Tocris
- L-glutamato – Merck
- N-metil-D-aspartato (NMDA)
- Percoll – Sigma
- PPO – Sigma
- Reagente de Folin
- Sacarose – Synth
- Sulfato de cobre – Merck
- Sulfato de magnésio – Merck
- Tartarato de sódio
- Tolueno – Synth
- Tris-(hidroximetil)-aminometano – Nuclear
- Triton X-100 – Nuclear
- Pipetas Pasteur
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Vials de 3 mL para cintilador
- Vidraria: provetas, placas de Petri, pipetas graduadas, potter de vidro com capacidade para 30 mL, béqueres
- 2,2'azobis-(2-anidino-propano)-dihidrocloride (ABAP) - Wako
- Trolox – Aldrich Chem.
- Glicina – Reagen
- Luminol – Sigma
- Ácido etilmalônico – Sigma
- Ácido metilsucínico – Sigma
- Fosfato de sódio monobásico heptahidratado - Reagen

- Fosfato de sódio dibásico monohidratado - Reagen

III. 1. 2. Equipamentos

- Agitador de tubos Quimis
- Balanças Acculab modelo V-200, Kern modelo 430-21 e Satorius Basic (analítica)
- Banho-Maria modelo 1052 Biomatic
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC 5B plus
- Centrífuga Eppendorf 5402
- Cintilador Wallac 1409
- Espectrofotômetro – Beckman DU 640
- Freezer -20°C – Prosdócimo e -70°C – Scien Temp – Adrian, Michigan – U.S.A.
- Homogeneizador elétrico Prufgerate Medingen
- Máquina de fazer gelo triturado marca Scotsman
- pHmetro Piccolo plus HI 1295
- Ultracentrífuga Optima L Rotor SW 28

III. 1. 3. Material permanente

- Pipetas automáticas marca Gilson de volume regulável
- Material cirúrgico (tesoura, bisturi, espátula)

III. 2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Germani, POA, RS, Brasil) contendo 20,5% proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

Ratos de 60 dias de vida foram usados para o estudo dos vários parâmetros do sistema glutamatérgico, já que nessa idade o sistema glutamatérgico já está desenvolvido e é considerado maduro.

Para as medidas de estresse oxidativo, animais com 30 dias de idade foram usados para as preparações dos homogeneizados.

III. 3. Preparação das fatias para a medida da captação de L-[³H]glutamato

Ratos Wistar foram decapitados sem anestesia e seus cérebros imediatamente removidos e submergidos em solução salina de glicose-Hank's balanceada (glicose HBSS). O córtex cerebral foi dissecado e a área parietal cortada em fatias de 0,4 mm de espessura usando um "tissue chopper" McIlwain. As fatias corticais foram lavadas em glicose HBSS e separadas com o auxílio de uma lupa. Às fatias consideradas controle, adicionaram-se 280 µL de glicose HBSS. Às fatias consideradas teste, adicionaram-se 260 µL de glicose HBSS e 20 µL dos ácidos a serem testados (AEM e AMS), os quais foram pré-incubados por 23 minutos. A medida da captação inespecífica foi realizada da mesma forma, porém sobre gelo.

III. 4. Captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral

A captação foi iniciada pela adição de 1,5 mM de glutamato contendo 0,33 µCi/mL de L-[³H]glutamato. A incubação foi interrompida depois de 7 minutos por duas lavagens com 1 mL de glicose-HBSS gelada, imediatamente seguida pela adição de 300 µL de NaOH 0,5 N para lisar o tecido. Após um período de aproximadamente 12 horas, alíquotas

do lisado foram utilizadas para a determinação do conteúdo intracelular de L- $[^3\text{H}]$ glutamato através de um contador de cintilação líquida.

III. 5. Preparação de membranas sinápticas plasmáticas

As membranas plasmáticas foram preparadas segundo o método de Emanuelli e colegas (1998). Para tanto, ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia. O cérebro foi isolado, pesado e homogeneizado em meio contendo 0,32 M de sacarose, 10 mM de MOPS/Trisma pH 7,4 e 1 mM de EGTA, na proporção de 1:10 (p/v). A homogeneização foi feita manualmente em homogeneizador de vidro. O tecido homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante denominado S1A foi mantido em gelo. O sedimento resultante foi homogeneizado novamente no mesmo volume e centrifugado na mesma velocidade e tempo. Os sobrenadantes S1A e S1B, resultantes da primeira e segunda centrifugações, respectivamente, foram centrifugados a 13000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado em MOPS/Tris/EGTA, pH 7,4 (meio hiposmótico) e mantido em gelo por 30 minutos para lisar as vesículas formadas no meio isosmótico. O sedimento, então, foi homogeneizado com tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5 mM até um volume final de 3,8-4,0 mL e aplicado sob um gradiente de sacarose (soluções de sacarose a 10%, 28,5% e 49%). Esse sistema sofreu centrifugação a 24000 rpm por 2 horas. Após essa centrifugação, a mielina contida na fase superior foi descartada e a fase da membrana retirada com o auxílio de pipeta Pasteur. Adicionou-se a ela 15 mL de tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5 mM, pH 7,4 e centrifugou-se a 17000 rpm por 15 minutos. O sedimento dessa centrifugação foi homogeneizado novamente em 10 mL de Tris/HCl ou Tris/Acetato 5mM, pH 7,4, sendo centrifugado na mesma velocidade e tempo anteriores. O pellet

resultante foi homogeneizado em um total de 3-4 mL de tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5mM, pH 7,4, homogeneizado, aliquotado em ependorfes e congelado a -70°C . No momento de uso das alíquotas, estas foram descongeladas e lavadas (homogeneizadas com 10 mL de tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5 mM, pH 7,4 e centrifugadas a 17000 rpm por 15 minutos). O sedimento resultante foi homogeneizado novamente com 10 mL de tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5 mM, pH 7,4 e incubado por 30 minutos a 37°C . Após esta incubação, repetiu-se a lavagem por mais 3 vezes. O sedimento da última centrifugação foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris/HCl ou Tris/Acetato 5 mM, pH 7,4, aliquotado e dosada sua concentração protéica.

III. 6. Ligação de L-[^3H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas

A incubação para a medida da ligação de L-[^3H]glutamato a seus receptores e/ou transportadores foi iniciada pela adição das membranas plasmáticas contendo Tris/Acetato 50mM ou Tris/Acetato 50 mM contendo NaCl 1,20 M, pH 7,4, respectivamente, com 40 nM de glutamato radioativo. A união inespecífica de glutamato foi medida pela adição de 40 μM de glutamato frio ao meio de incubação. Os ácidos etilmalônico e metilsucínico foram diluídos em água tridestilada e tamponados com hidróxido de potássio. Suas concentrações finais no meio de incubação variaram de 0,01 a 1,0 mM. Os controles não continham os ácidos referidos. Após a adição das membranas plasmáticas, a incubação foi feita em banho a 30°C por 30 minutos. O processo foi interrompido por centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, lavou-se cuidadosamente o sedimento com água destilada gelada (4°C) a fim de remover a radioatividade não incorporada. Depois de seco, o sedimento foi solubilizado com 300 μL

de solução de dodecil sulfato de sódio 0,1% por 24 horas. Um volume de 240 μ L da membrana solubilizada foi misturado a 1,5 mL de líquido de cintilação (Optiphase 'Hisafe' 3 - Wallac) e a radioatividade foi medida em cintilador. A ligação específica de L-[3 H]glutamato foi calculada descontando-se a ligação inespecífica.

III. 7. Preparação das vesículas sinápticas

As vesículas sinápticas foram preparadas a partir de cérebro de ratos, conforme Fykse e Fonnum (1996), com algumas modificações. O homogeneizado (1:10, peso/volume) de cérebro dos ratos feito em tampão contendo 0,32 M de sacarose, 10 mM de tampão MOPS /Tris, pH 7,4 e 1 mM de EGTA foi centrifugado duas vezes por 10 minutos a 3000 rpm. Ambos os sobrenadantes foram unidos e centrifugados por 30 minutos a 13000 rpm para obter a fração sinaptossomal crua (P2). Esta fração sofreu um choque osmótico pela ressuspensão em MOPS/Tris 10 mM, pH7,4, contendo 0,1 mM de EGTA (aproximadamente 0,8 mL/g de tecido fresco), sendo após centrifugada a 12000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante contendo as vesículas sinápticas foi aplicado em um gradiente de densidade de sacarose de 0,4 M a 0,6 M e este foi centrifugado a 22000 rpm por duas horas. A fração de vesícula sináptica foi isolada da banda de sacarose a 0,4 M e estocada a -70°C por até 4 semanas sem perda da atividade. Estudos conduzidos por outros grupos mostraram que esta fração não contém estruturas contaminantes que possam interferir na captação de glutamato por vesículas sinápticas. Utilizaram-se também controles com adição de altas concentrações de sódio para avaliar a presença de possíveis vesículas contaminantes formadas de membranas plasmáticas. Em todas as preparações de vesículas sinápticas testadas, a captação não foi estimulada pela adição de sódio (dados não mostrados).

III. 8. Captação de L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas

O meio padrão para a captação de L-[³H]glutamato foi constituído por 10 mM de MOPS/Tris, pH 7,4, 4mM de KCl, 140 mM de gluconato de potássio, 0,12 M de sacarose, 2mM de MgCl₂, 2mM de ATP e 50 µM de L-[³H]glutamato no meio padrão (3µCi/mL), totalizando um volume final de 200 µL, conforme Wolosker *et al* (1996). Em experimentos para a avaliação do efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, os metabólitos foram adicionados ao meio de captação nas concentrações de 0,01- 1,0 mM. A captação foi iniciada pela adição das vesículas sinápticas (50 µg de proteína/tubo). O sistema foi incubado por 10 minutos a 35°C e a reação foi interrompida por filtração rápida do meio de ensaio através de filtros Millipore de 0,45 µm. Os filtros foram rapidamente lavados três vezes com 4 mL de tampão MOPS/Tris 10 mM, pH 7,4, à temperatura ambiente. A captação específica foi calculada pelo desconto da captação medida na ausência de ATP (captação inespecífica). A radioatividade foi medida por um cintilador líquido da marca Wallac.

III. 9. Preparação das amostras para as medidas de estresse oxidativo

Ratos Wistar de 30 dias de idade foram decapitados por guilhotina sem anestesia. A caixa craniana foi aberta, seu conteúdo retirado e mantido em uma placa de Petri invertida sobre gelo. O cerebelo, o bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. O excesso de sangue dos vasos externos foi retirado com papel filtro. O córtex foi então separado, pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,4 numa proporção de 1:10. Após homogeneização, foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a incubação com os metabólitos (ácidos etilmalônico e

metilsucínico) nas concentrações 0,01-1,0 mM, sendo o controle incubado com a mesma quantidade de tampão (específico para cada técnica). Os metabólitos testados tiveram o pH acertado próximo a 7,4 com uma solução de NaOH. As amostras utilizadas para as medidas de quimiluminescência e TRAP foram utilizadas imediatamente após o preparo. As amostras preparadas para a medida das substâncias reativas ao TBA foram congeladas em freezer -70°C e descongeladas para o uso.

III. 10. Potencial Antioxidante Total (TRAP)

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido foi realizada segundo o método de Lissi *et al.* (1992). Esta determinação é dada pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) (ABAP) à temperatura ambiente. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 μM) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Para a contagem basal (120 segundos), foram adicionados 4 mL de solução de ABAP 10 mM ao vial. A seguir, 10 μL da solução de luminol foram acrescentados e lidos por mais 120 segundos. Após a leitura do luminol junto com o ABAP, essa medida foi considerada o valor inicial. Foram colocados, então, 10 μL da solução de Trolox 80 μM , o qual diminuiu essa luminescência por determinado tempo até os valores iniciais. O tempo necessário para que a luminescência retorne ao valor inicial foi considerado o tempo de indução. O tempo indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido

comparado com o tempo de indução do Trolox. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

III. 11. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi baseada no método utilizado por Yagi (1998).

Em tubos de ensaio, foram pipetados 125 μ L de homogeneizado de córtex cerebral e 10 μ L das substâncias a serem testadas (uma a uma), exceto nos controles, onde foram adicionados 10 μ L de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo cloreto de potássio 140 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 375 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% contendo 7,1% de sulfato de sódio. Os tubos foram colocados em banho fervente por 15 minutos e, após retirados, foram resfriados à temperatura ambiente. A extração das TBA-RS foi feita com a adição de 0,75 mL de n-butanol seguida de agitação vigorosa de cada tubo por 40 segundos em um agitador de tubos. Os tubos foram centrifugados em uma centrífuga clínica a 3000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para uma cubeta e a absorbância foi medida em um fluorímetro a 535 nm com excitação a 515 nm. A quantidade de TBA-RS foi calculada em nmol por mg de córtex cerebral usando o coeficiente de extinção de $156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em nmóis de MDA/mg de proteína.

III. 12. Quimiluminescência

A determinação da quimiluminescência foi realizada conforme o método de Gonzalez-Flecha *et al.* (1991). As amostras foram inicialmente incubadas por uma hora a 37°C em uma proporção de 4 partes de amostra para uma parte de tampão (controles) ou dos ácidos a serem testados (AEM e AMS). A concentração final dos ácidos no meio foi 1,0 mM. Aos frascos de cintilação foram adicionados 3,5 mL de um meio constituído de fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4. Estes foram colocados no cintilador líquido beta para a medida de quimiluminescência basal por 5 minutos. Após esta leitura basal, 500 µL de amostra (incubada com tampão ou ácido) foram adicionados imediatamente ao meio. Este sistema foi lido por mais 15 minutos. Todo o procedimento foi realizado em sala escura e à temperatura ambiente. Os frascos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório, com solução detergente (extran 20%), exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 minutos e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento. A contagem basal foi descontada do valor total e o resultado expresso em cps/mg de proteína.

III. 13. Medida de proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry *et al* (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

III. 14. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) de

uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. O teste de regressão linear foi também utilizado para se verificar efeitos de dose-resposta. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

IV. RESULTADOS

IV. 1. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos

Estudou-se inicialmente a influência dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos. A figura IV.1. mostra que o ácido etilmalônico diminuiu significativamente a captação de L-[³H]glutamato [F(3,20)=3,962, p<0,01] nas concentrações de 0,01, 01 e 1,0 mM. A figura IV.2. mostra que o ácido metilsucínico também diminuiu significativamente a captação de L-[³H]glutamato [F(3,12)=10,845, p<0,001] nas mesmas concentrações.

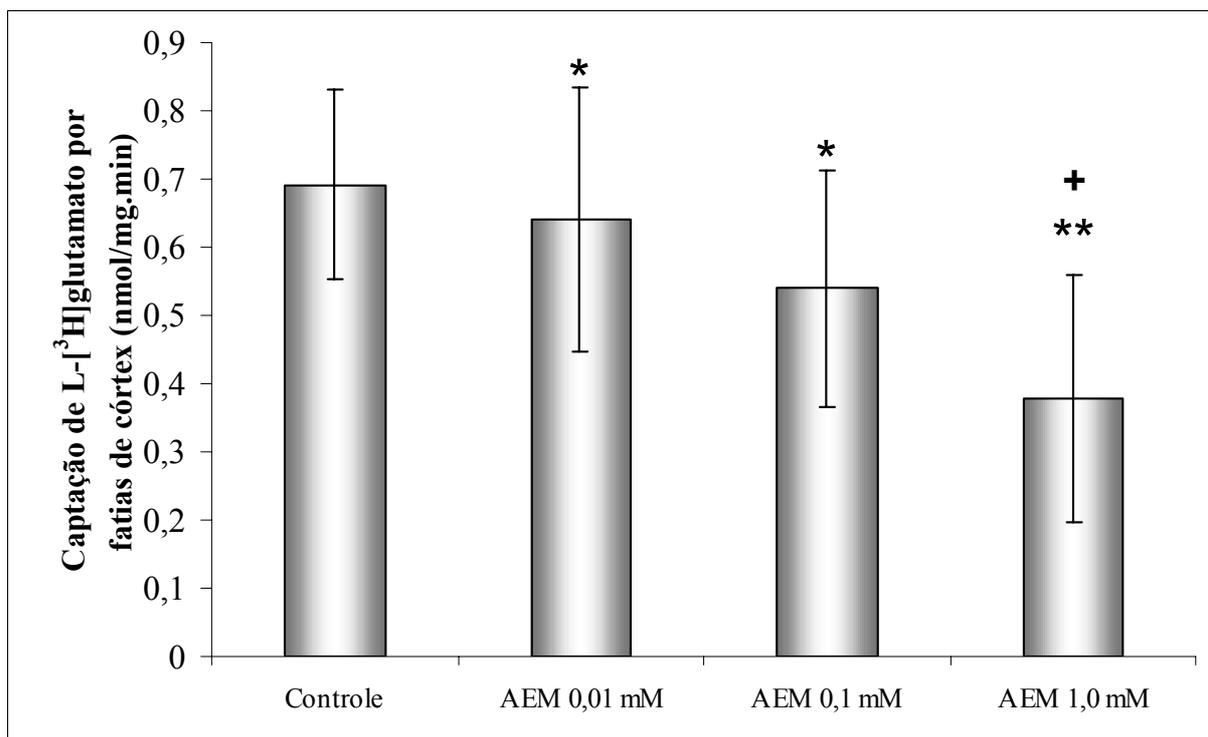


Figura IV.1. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (AEM) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos e estão expressos em nmol/mg.min. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado aos controles: + $p < 0,05$ com relação a 0,01 e 0,1 mM).

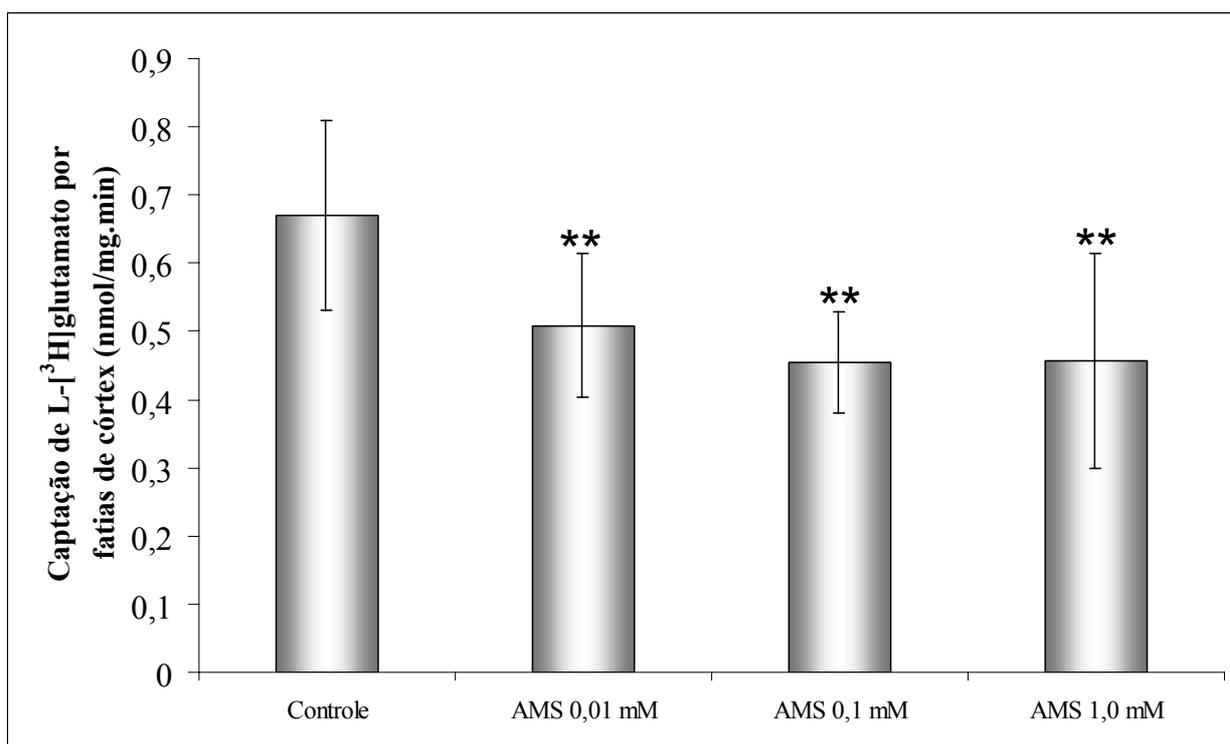


Figura IV.2. Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico (AMS) sobre a captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral de ratos.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em nmol/mg.min. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparado aos controles).

IV. 2. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas sinápticas plasmáticas de cérebro de ratos na presença ou ausência de íons sódio no meio de incubação

Verificamos que os ácidos etilmalônico e metilsucínico inibiram a união do L-[³H]glutamato às membranas em todas as concentrações testadas (0,01 a 1 mM) em um sistema de incubação sem íons sódio e cloreto (Figuras IV.3. e IV.4.) [AEM: $F(3,12)=88,192$, $p<0,0001$; AMS: $F(3,12)=95,473$, $p<0,0001$]. Esses resultados indicam que, nestas concentrações, os ácidos inibem a ligação de glutamato a receptores, visto que na ausência de sódio a ligação se dá predominantemente nestas estruturas.

Observamos também que a união de L-[³H]glutamato a membranas sinápticas em meio com sódio na presença dos ácidos etilmalônico e metilsucínico foi inibida por ambos os ácidos somente na concentração de 1 mM (Figuras IV.5. e IV.6.) [AEM: $F(3,12)=7,469$, $p<0,01$; AMS: $F(3,12)=4,589$, $p<0,05$]. Esses resultados sugerem que na presença desses ácidos a ligação do glutamato em seus transportadores é inibida nesta concentração visto que, em nossas condições experimentais (altas concentrações extracelulares de sódio), medimos a união do glutamato predominantemente a sítios sódio-dependentes (transportadores).

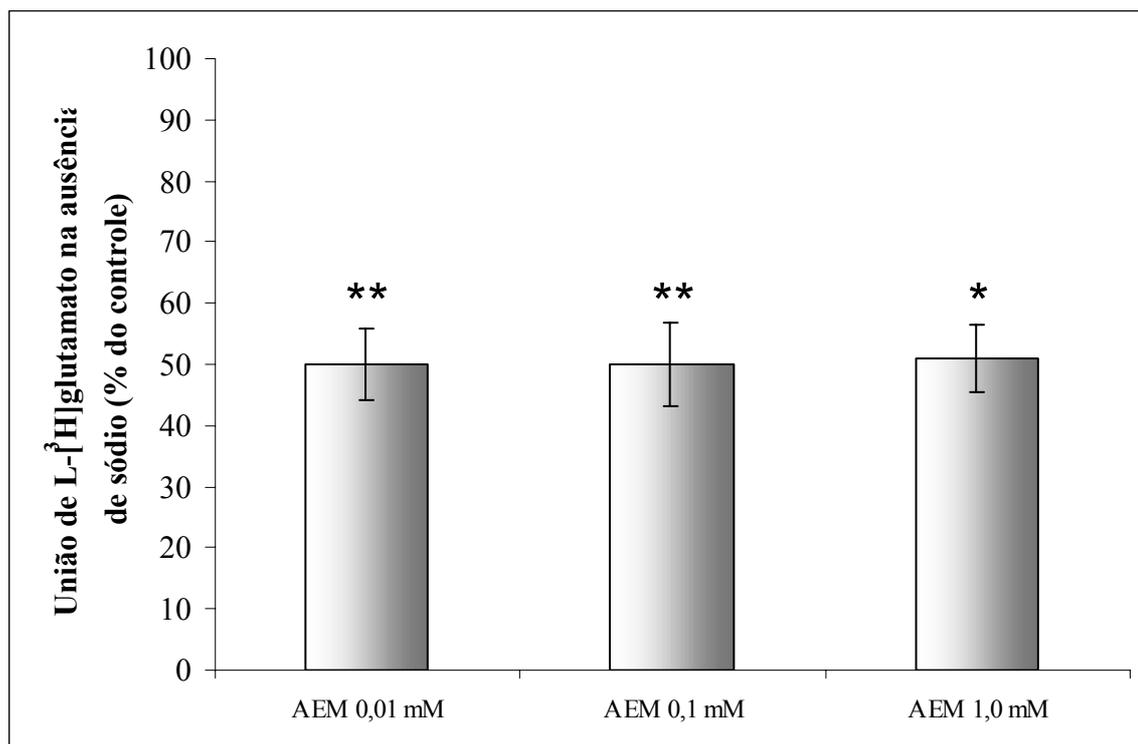


Figura IV.3. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (AEM) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos, na ausência de íons sódio no meio de incubação.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em percentagem do controle (11,65 pmol/mg.min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparado aos controles).

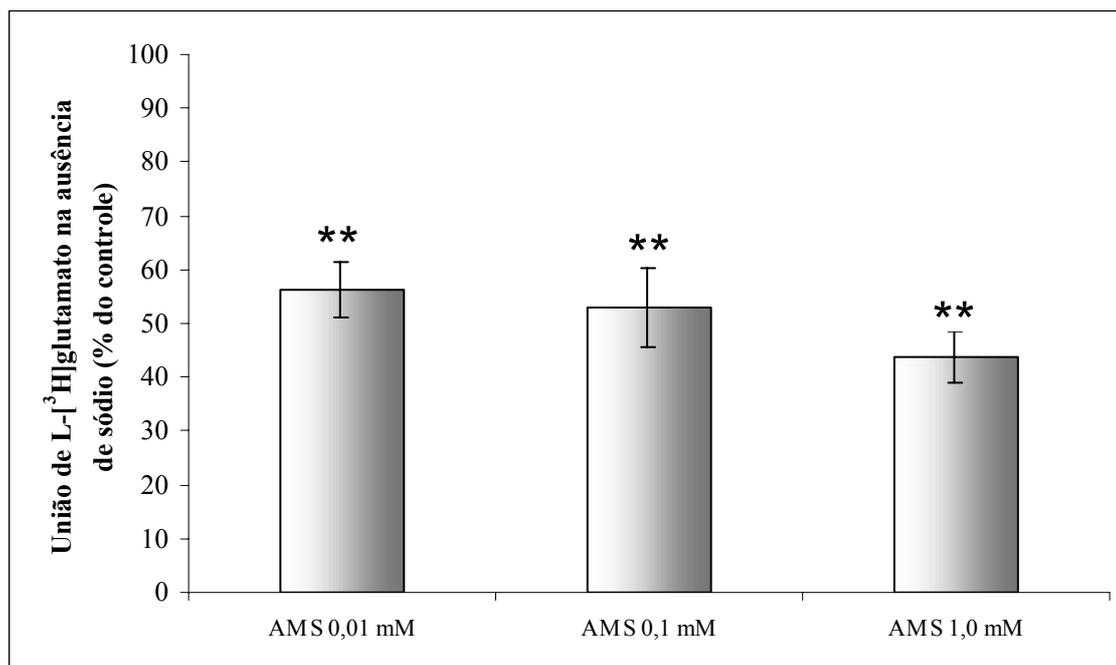


Figura IV.4. Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na ausência de íons sódio no meio de incubação.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em percentagem do controle (11,65 pmol/mg.min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparado aos controles).

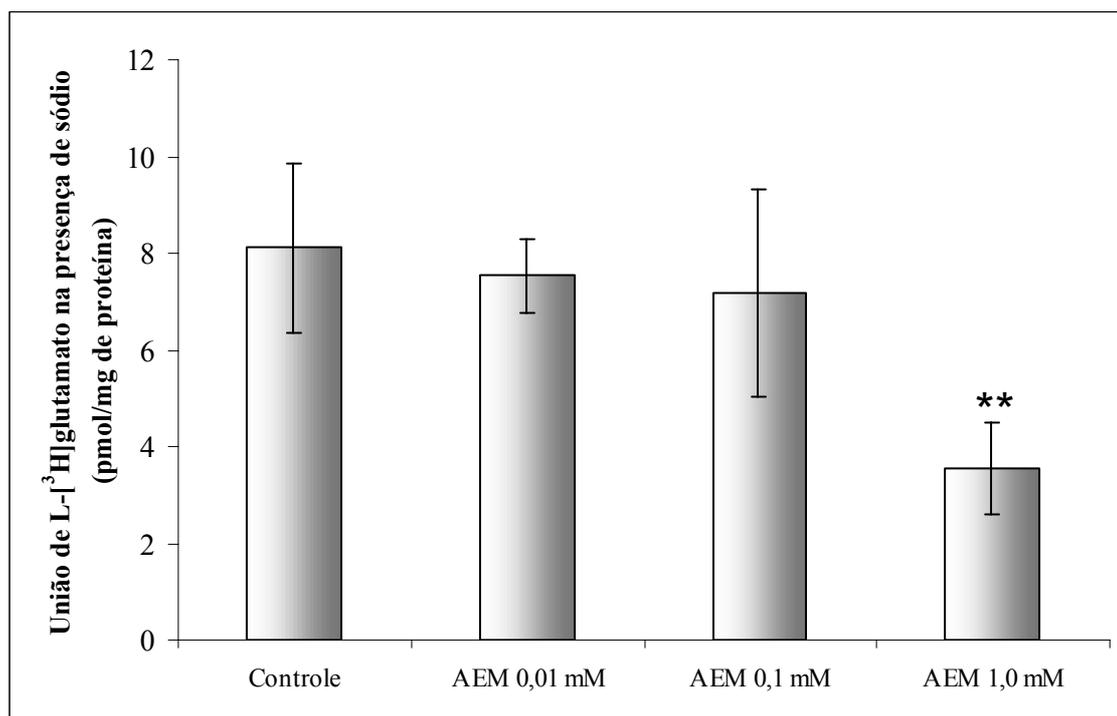


Figura IV.5. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (AEM) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na presença de íons sódio no meio de incubação.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em pmol/mg.min. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparado aos controles).

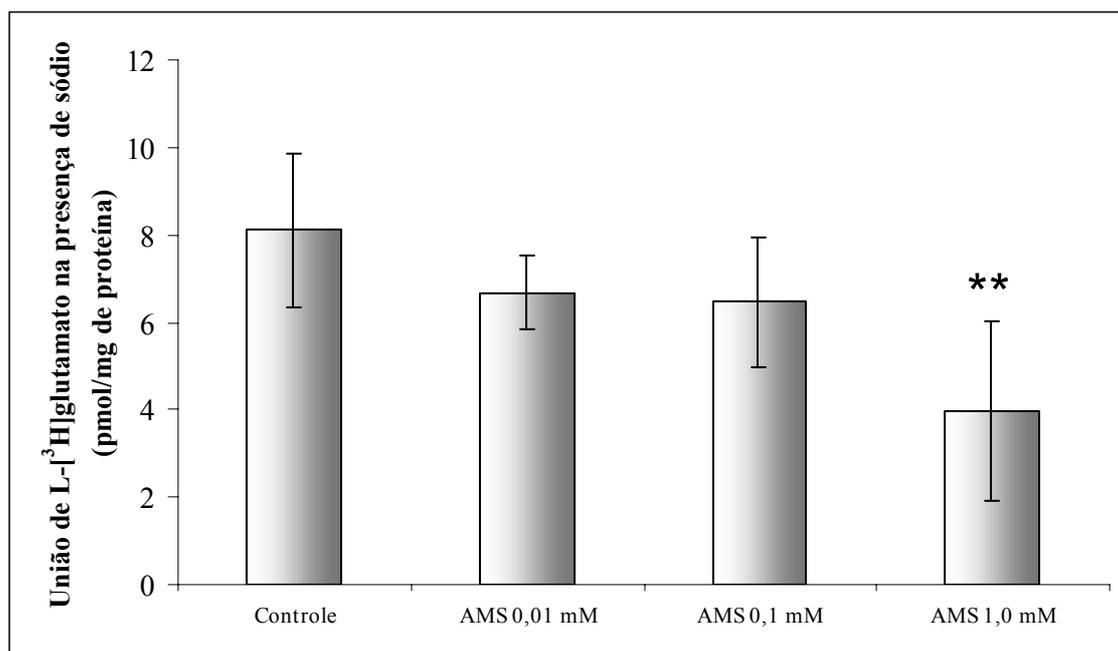


Figura IV.6. Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico (AMS) sobre a união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas de cérebro de ratos na presença de íons sódio no meio de incubação.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em pmol/mg.min. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparada aos controles).

IV. 3. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a captação do L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos

Foi investigado o efeito dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS), nas concentrações de 0,01 a 1 mM, sobre a captação de glutamato por preparações de vesículas sinápticas.

A figura IV.7. mostra que o ácido etilmalônico não alterou a captação de L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas nas concentrações testadas [$F(3,20)=0,573$, $p>0,05$]. Por outro lado, o ácido metilsucínico inibiu a captação vesicular nas mesmas concentrações, [$F(3,20)=9,886$, $p<0,001$] de uma forma dose-dependente ($\beta = -0,515$, $p<0,01$) (Figura IV.8.).

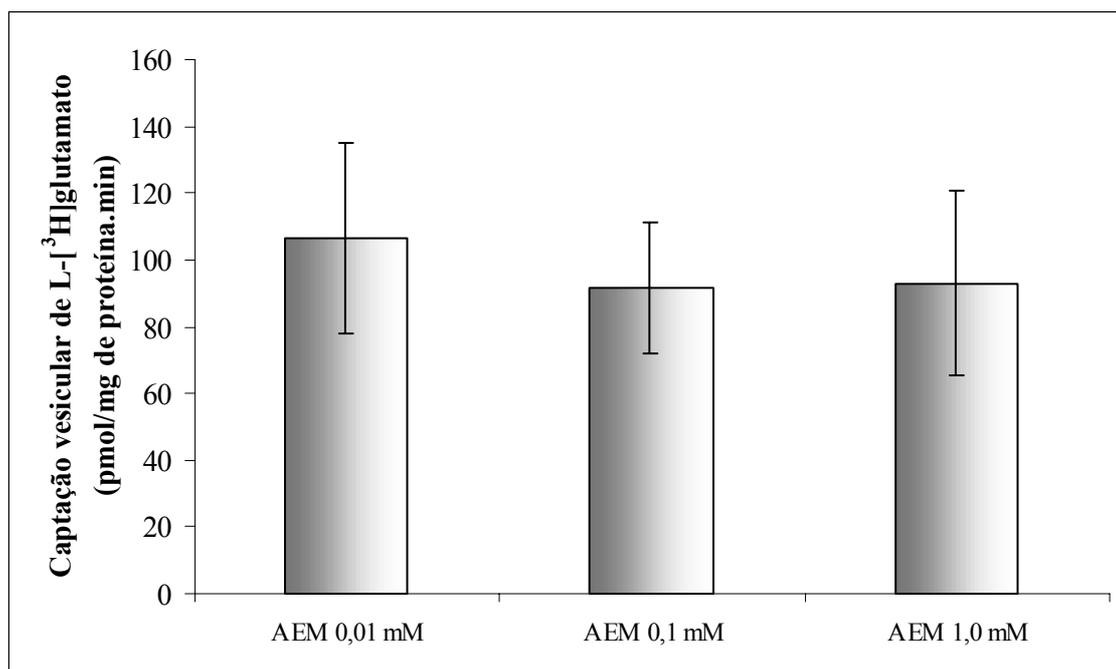


Figura IV.7. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (AEM) sobre a captação do L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos e estão expressos em porcentagem do controle (6,75 pmol/mg.min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os vários grupos.

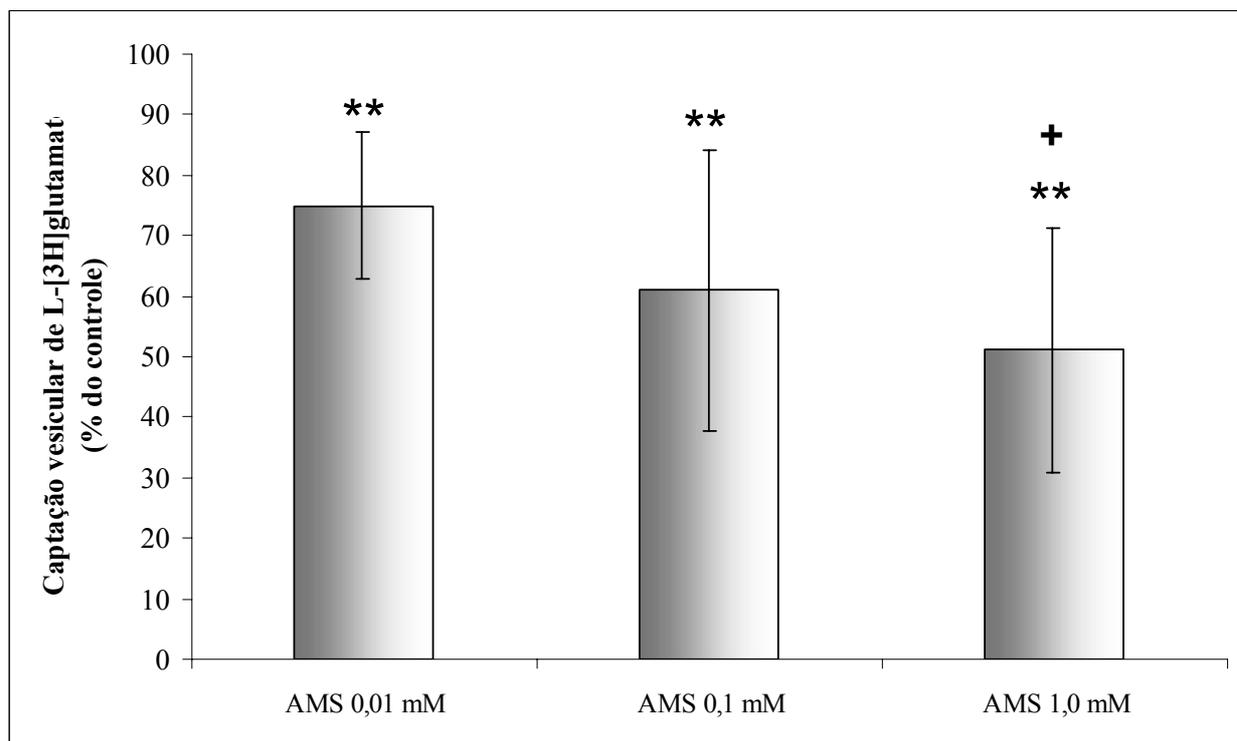


Figura IV.8. Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico (AMS) sobre a captação do L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro de ratos.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos e estão expressos em percentagem do controle (9,47 pmol/mg.min). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $p < 0,01$ comparado aos controles; + $p < 0,05$ com relação a 0,01 mM).

IV. 4. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens

Conforme mostrado na figura IV.9., os ácidos etilmalônico e metilsucínico, testados na concentração de 1,0 mM, não exerceram efeito significativo sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [F(2,15)=0,336, p>0,05].

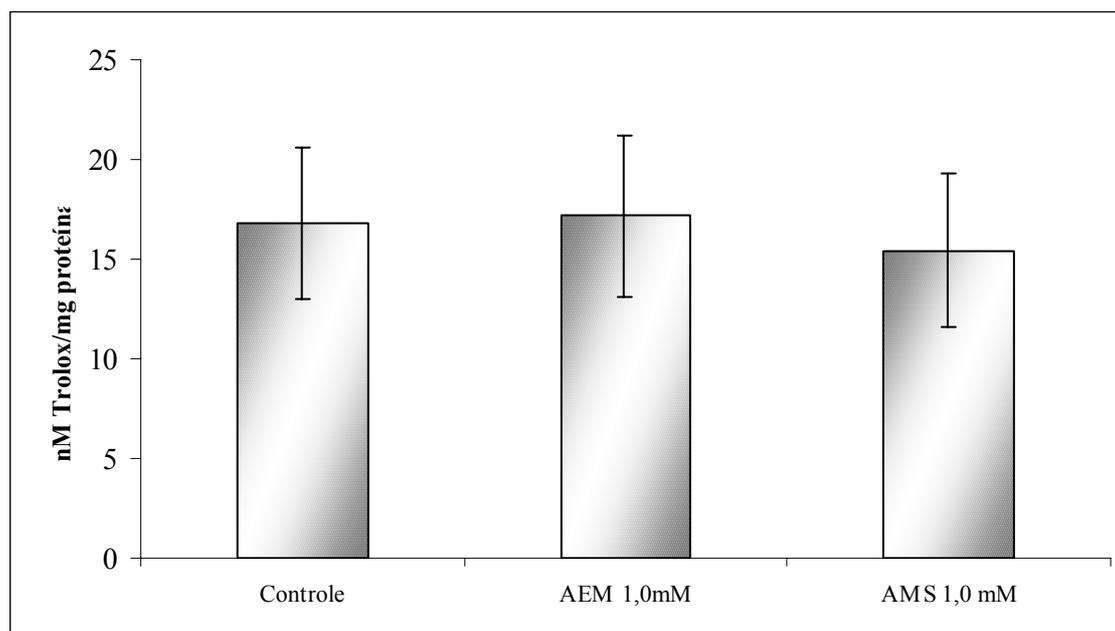


Figura IV.9. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos e estão expressos em nmol/mg de proteína. Não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via).

IV. 5. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens

O ácido etilmalônico não alterou a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), testadas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens. (Figura IV.10 [F(3,12)=0,274, $p>0,05$]. Resultados semelhantes foram observados para o ácido metilsucínico (figura IV.11. [F(3,12)=0,110, $p>0,05$]).

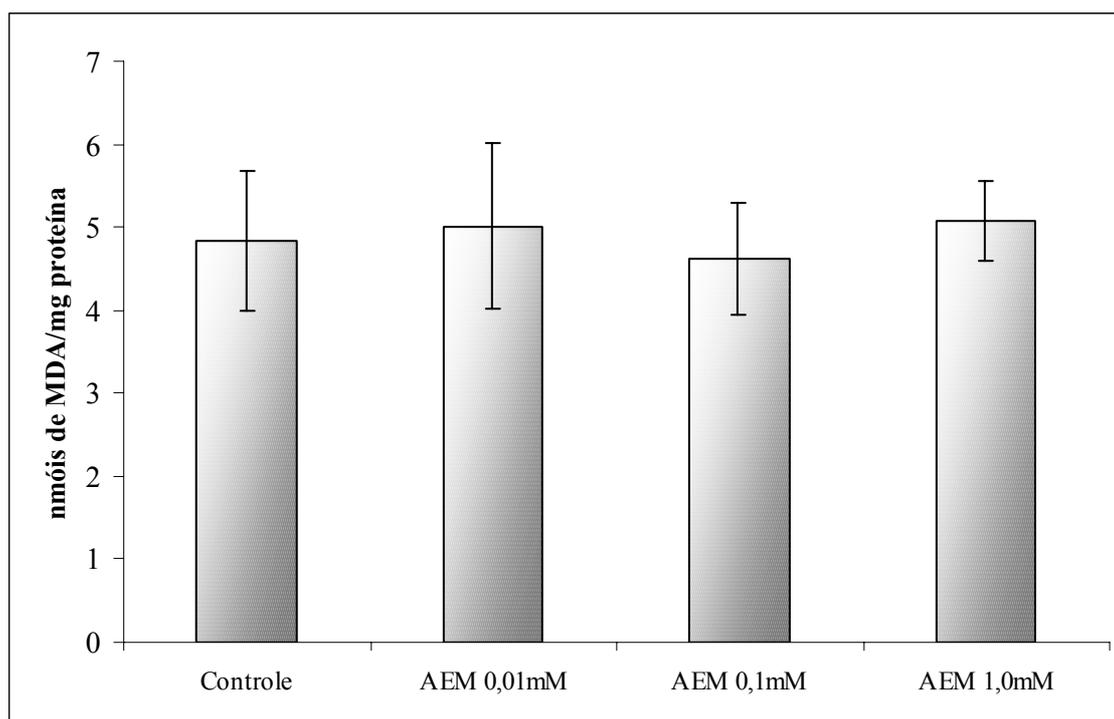


Figura IV.10. Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (AEM) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em nmóis de MDA/mg de proteína. Não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via).

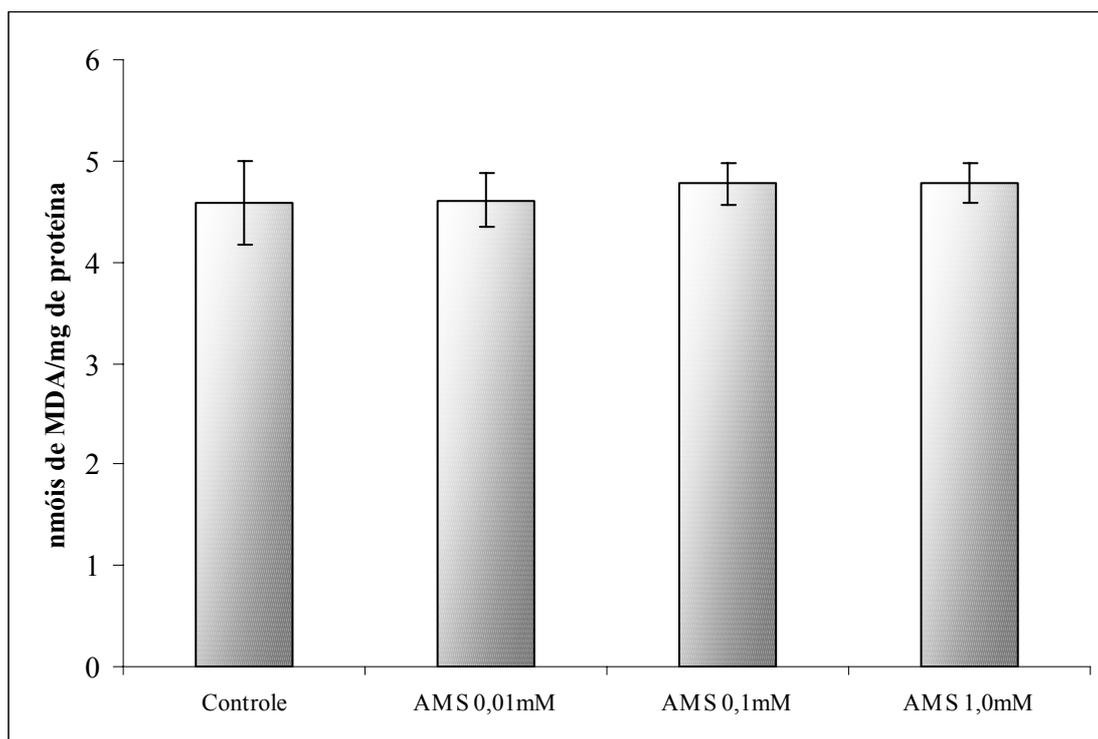


Figura IV.11. Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico (AMS) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos e estão expressos em nmóis de MDA/mg de proteína. Não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via).

IV. 6. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens

A figura IV.12. mostra o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, utilizados na concentração de 1,0 mM no sistema de incubação, sobre a medida de quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Verificou-se que ambos os ácidos não alteram essa medida [$F(2,15)=0,116$, $p>0,05$].

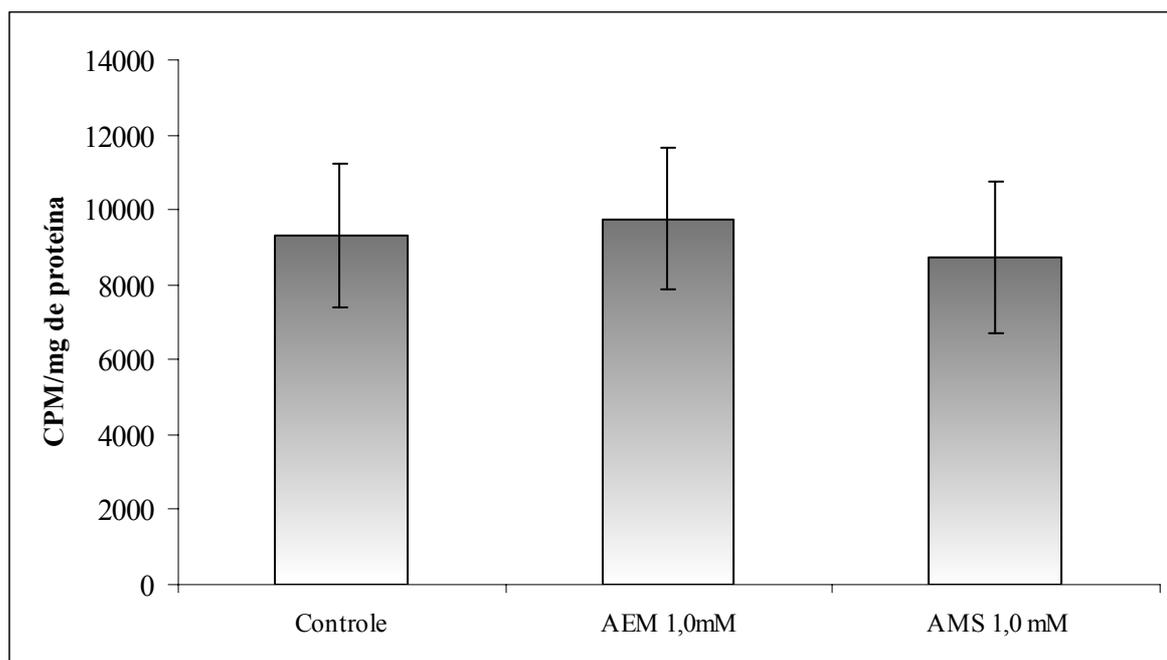


Figura IV.12. Efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico (AEM) e metilsucínico (AMS) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos e estão expressos em CPM/mg de proteína. Não houve diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via).

V. DISCUSSÃO

A deficiência de enzima desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD) é um distúrbio metabólico hereditário da oxidação de ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos). A SCAD está localizada na matriz mitocondrial e catalisa a desidrogenação dos ácidos graxos de cadeia curta, convertendo-os em enoil-CoA. Um defeito nesta enzima causa o acúmulo de butirilglicina e butirilcarnitina, e principalmente dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, formados pela metabolização da butiril-CoA por rotas secundárias (Roe e Coates, 2001; Tein *et al*, 1999).

Esta doença manifesta-se principalmente no período neonatal, podendo manifestar-se também durante a infância e até mesmo na idade adulta (Bhala *et al*, 1995). A sintomatologia dessa doença é bastante heterogênea, embora a encefalopatia e a miopatia sobressaiam-se. Embora a maioria dos pacientes apresentem sinais neurológicos graves e fraqueza muscular, apresentam também acidose metabólica, acidose láctica, vômitos, atraso no desenvolvimento, convulsões, fraqueza muscular e miopatia crônica (Ribes *et al*, 1998; Tein *et al*, 1999; Bhala *et al*, 1995; Corydon *et al*, 1996).

A deficiência de SCAD diferencia-se de outros defeitos na oxidação de ácidos graxos por não apresentar episódios de hipoglicemia hipocetótica e por apresentar sinais neurológicos, tais como hipotonia, hipertonia, hiperatividade ou retardo no desenvolvimento psicomotor (Tein *et al*, 1999; Bhala *et al*, 1995). A sintomatologia característica apresentada pelos pacientes afetados por essas desordens consiste de encefalopatia e miopatia, cuja patogênese não está ainda esclarecida. No entanto, as alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes portadores dessa deficiência podem estar relacionadas ao acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta e à sua toxicidade ao

sistema nervoso central (Bhala *et al*, 1995; Dawson *et al*, 1995). Essa doença é potencialmente letal em situações de crise aguda ou descompensação metabólica. Neste caso, quando os níveis dos metabólitos aumentam, os pacientes apresentam-se mais profundamente afetados, manifestando usualmente coma e edema cerebral (Roe e Ding, 2001).

Tendo em vista que os mecanismos responsáveis pela disfunção neurológica na deficiência da SCAD são praticamente desconhecidos, o presente trabalho teve por objetivo investigar a ação dos principais metabólitos acumulados nesta doença (ácidos etilmalônico e metilsucínico), sobre alguns parâmetros do sistema glutamatérgico e de estresse oxidativo em cérebro de ratos no intuito de esclarecer a etiopatogenia do dano cerebral característico dos pacientes afetados por esse distúrbio. Neste contexto, nosso laboratório recentemente demonstrou efeitos excitotóxicos para os ácidos α -cetoisovalérico e glutárico que se acumulam em outros distúrbios do metabolismo de ácidos orgânicos (Coitinho *et al*, 2001, Porciúncula *et al*, 2000).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, sendo fundamental para os processos de desenvolvimento e função do SNC, transmissão sináptica, plasticidade sináptica, aprendizado, memória, visão e audição (Collingridge e Lester, 1989, Izquierdo *et al*, 1994; Ozawa *et al*, 1998; Artola e Singer, 1987; Ito, 1989). É importante salientar que alterações no sistema glutamatérgico ocorrem em várias patologias neurodegenerativas (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell, 1994; Matés *et al*, 1999; Halliwell e Gutteridge, 1999). O glutamato é liberado para a fenda sináptica onde atua sobre seus receptores, sendo após retirado da fenda por transportadores localizados nos astrócitos e nos neurônios pós-sinápticos. Alterações nesse sistema tornam o cérebro mais vulnerável aos efeitos patológicos (excitotóxicos) do glutamato.

Portanto, investigamos inicialmente o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os seguintes parâmetros do sistema glutamatérgico em córtex cerebral ou cérebro total de ratos: captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral, união de L-[³H]glutamato em membranas plasmáticas sinápticas isoladas de cérebro total (na presença e/ou ausência de íons sódio) e captação do L-[³H]glutamato por vesículas sinápticas de cérebro total de ratos. Para esta investigação, utilizamos ratos de sessenta dias, pois nessa idade os receptores e transportadores de glutamato já estão completamente expressos no cérebro do rato (Insel *et al*, 1990; Miller *et al*, 1990).

Verificamos que os ácidos etilmalônico e metilsucínico promoveram uma diminuição significativa na captação de L-[³H]glutamato por fatias de córtex cerebral na concentrações de 0,01, 01 e 1,0 mM. Além disso, os dois metabólitos provocaram uma diminuição da ligação de L-[³H]glutamato a membranas sinápticas na ausência de sódio no meio de incubação em todas as concentrações testadas (0,01 – 1,0 mM) e, quando em presença de sódio, houve diminuição significativa dessa união somente na concentração de 1,0 mM. A inibição da captação de glutamato a membranas sinápticas na ausência de sódio indica diminuição da união de neurotransmissor aos seus receptores, enquanto o mesmo efeito (diminuição da união do glutamato) na presença de sódio indica diminuição dessa união preponderantemente aos transportadores do glutamato. A menor ligação a seus receptores e/ou transportadores pode ser devida à diminuição do número de receptores/transportadores ou à diminuição da afinidade do glutamato. Tendo em vista que nossos resultados foram obtidos em membranas sinápticas purificadas, o fator determinante para explicar o efeito observado provavelmente foi a redução da afinidade do glutamato. Por sua vez, a diminuição da afinidade pelo glutamato a seus transportadores

poderia explicar também a diminuição na captação do glutamato pelas fatias de córtex cerebral de ratos.

Por outro lado, não foi verificado qualquer efeito do ácido etilmalônico sobre a captação vesicular de L-[³H]glutamato nas concentrações utilizadas. Distintamente do que ocorreu com o ácido etilmalônico na captação vesicular de glutamato, observamos uma diminuição dessa captação causada pelo ácido metilsucínico em todas as concentrações testadas. Devemos enfatizar que a captação de glutamato por vesículas sinápticas ocorre por um sistema distinto daquele das membranas gliais e neuronais que depende de sódio para sua atividade. O sistema de transporte de glutamato das vesículas sinápticas utiliza um gradiente de H⁺ e necessita ATP. O acúmulo do neurotransmissor dentro das vesículas sinápticas ocorre por um processo promovido por um gradiente eletroquímico transmembrana de prótons (ΔpH e $\Delta\Psi$) gerado por uma H⁺-ATPase vacuolar localizada na membrana da vesícula. Embora o ATP seja essencial para estabelecer o gradiente eletroquímico gerado pela H⁺-ATPase vacuolar para a incorporação de glutamato dentro das vesículas sinápticas, nossos resultados não poderiam ser devidos à inibição da produção de energia causada pelos ácidos estudados, pois o meio de incubação usado para a captação de glutamato nas vesículas era rico em energia (2 mM ATP).

Em resumo, nossos resultados demonstram alterações importantes no sistema glutamatérgico causadas pelos ácidos acumulados na deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta. A diminuição da captação de glutamato provocada pelos ácidos etilmalônico e metilsucínico por fatias de córtex cerebral sugere que o neurotransmissor possa ficar em maior quantidade na fenda sináptica. Dessa forma, é possível postular que a alteração do sistema glutamatérgico pelos principais metabólitos acumulados na deficiência da SCAD possa explicar, ao menos em parte, a disfunção neurológica dos

pacientes afetados por esta doença, caracterizada por atraso psicomotor, retardo mental e outras manifestações neurológicas, bem como na acidúria etilmalônica encefalopática e nas outras doenças neurodegenerativas em que as concentrações do ácido etilmalônico estão elevadas (Burlina *et al*, 1994).

O passo seguinte foi investigar o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens, tais como a medida do potencial antioxidante total (TRAP), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a medida da quimiluminescência. Foi verificado que os dois ácidos não afetaram a lipoperoxidação, medida através do TBA-RS e quimiluminescência, e tampouco as defesas antioxidantes não-enzimáticas, medidas através do TRAP. Embora não tenhamos medido o efeito desses ácidos sobre as defesas antioxidantes enzimáticas representadas pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, os resultados dos parâmetros analisados no presente trabalho sugerem que os ácidos acumulados na deficiência da SCAD não induzem lipoperoxidação ou alteram as defesas antioxidantes não enzimáticas. Tendo em vista que o aumento da produção de radicais livres (verificado por aumento de TBA-RS – lipoperoxidação) e/ou a diminuição das defesas antioxidantes são indicativos de estresse oxidativo, os resultados da presente investigação sugerem que os ácidos etilmalônico e metilsucínico não induzem estresse oxidativo. A influência desses metabólitos sobre a indução de estresse oxidativo, no entanto, somente poderá ser estabelecida após investigação de outros parâmetros de estresse oxidativo.

Por outro lado, pacientes com deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta apresentam preponderantemente aumento nos níveis de ácido lático no sangue e na urina, o que poderia refletir um comprometimento do metabolismo energético

mitocondrial. Interessante também é a observação de que esses pacientes apresentam hipotonia severa, o que poderia estar relacionado com déficit energético. Nesse particular, nosso laboratório recentemente mostrou que a atividade da creatina quinase mitocondrial é significativamente inibida pelo ácido etilmalônico em córtex cerebral, mas não em músculo esquelético e cardíaco de ratos jovens (Schuck *et al*, 2002, Leipnitz *et al*, 2002). Tais resultados, associados aos da presente investigação demonstrando uma alteração do sistema glutamatérgico causada pelos ácidos etilmalônico e metilsucínico poderiam explicar, ao menos em parte, os sintomas neurológicos encontrados nos pacientes com deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta. No entanto, a fisiopatogenia da fraqueza e hipotonia musculares que ocorrem nesta doença continua desconhecida.

Em resumo, os achados do presente estudo realizado *in vitro* indicam que os ácidos etilmalônico e metilsucínico provocam alterações no sistema glutamatérgico em cérebro de ratos. Por outro lado, esses ácidos não parecem induzir estresse oxidativo, demonstrado pelos parâmetros analisados. Seria interessante testar o efeito *in vivo* desses metabólitos sobre os parâmetros analisados no presente trabalho. Neste sentido, foi recentemente descrito um camundongo mutante BALB/cByJ que possui vários aspectos bioquímicos e patológicos semelhantes aos pacientes com deficiência de SCAD (Wood *et al*, 1989). Esses camundongos apresentam acidúria etilmalônica e metilsucínica semelhante a dos pacientes afetados pela deficiência de SCAD, acompanhada de excreção de butirilglicina. O modelo animal da deficiência da SCAD pode, portanto, tornar-se importante na realização de estudos *in vivo*, tais como os relacionados ao sistema glutamatérgico e à produção de estresse oxidativo, que seriam úteis para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença. Seria também interessante desenvolver modelos químicos de acidemia etilmalônica e metilsucínica através da administração dos ácidos etilmalônico e

metilsucínico com o mesmo objetivo da presente investigação, ou seja, estudar o efeito *in vivo* desses metabólitos sobre os parâmetros analisados no presente estudo. O modelo químico oferece a oportunidade de verificar separadamente o efeito de cada ácido em cada um dos parâmetros a serem testados, distintamente do variante genético em que todos os metabólitos estão com sua concentração alterada e os efeitos detectados serão sinérgicos.

Portanto, fica a perspectiva de se desenvolver modelos animais químicos de acidúria etilmalônica e metilsucínica na tentativa de continuar a investigação dos mecanismos fisiopatológicos do dano tecidual na deficiência da SCAD.

VI. CONCLUSÕES

- O ácido etilmalônico diminuiu significativamente a captação de glutamato por fatias de córtex cerebral nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM. O ácido metilsucínico teve uma ação similar, com efeito inibitório nas mesmas concentrações testadas.

- A união de L-[³H]glutamato a membranas plasmáticas de córtex cerebral de ratos na ausência de sódio foi diminuída pelos ácidos etilmalônico e metilsucínico em todas as concentrações testadas (0,01 – 1,0 mM). Quando em presença de sódio, ambos os ácidos provocaram uma diminuição dessa união somente na concentração de 1 mM.

- O ácido etilmalônico não alterou a captação vesicular de L-[³H]glutamato em cérebro de ratos nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM utilizadas, enquanto o ácido metilsucínico provocou uma diminuição dessa captação em todas as concentrações testadas.

- Tais resultados sugerem que os ácidos etilmalônico e metilsucínico alteram o sistema glutamatérgico.

- As defesas antioxidantes não-enzimáticas, representadas pela medida do potencial antioxidante total (TRAP), não foram alteradas no córtex cerebral de ratos pelos ácidos etilmalônico e metilsucínico.

- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico não afetaram a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos.

- A medida de quimiluminescência não foi alterada pelos ácidos etilmalônico e metilsucínico em córtex cerebral de ratos.

- Tais resultados sugerem que os ácidos etilmalônico e metisucínico não induzem lipoperoxidação ou alteram as defesas antioxidantes não enzimáticas em cérebro de ratos.

VII. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, investigando a ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre outros parâmetros do sistema glutamatérgico e de estresse oxidativo, bem como a ação *in vivo* desses ácidos sobre os mesmos parâmetros analisados no presente trabalho.

1. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a captação de glutamato por sinaptossomas em córtex cerebral de ratos.
2. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a liberação de glutamato por sinaptossomas em córtex cerebral de ratos.
3. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a captação de glutamato por astrócitos cultivados em córtex cerebral de ratos.
4. Estudar o mecanismo de ação dos efeitos causados pelos ácidos sobre o sistema glutamatérgico.
5. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre as defesas enzimáticas antioxidantes representadas pela atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em córtex cerebral de ratos.
6. Desenvolvimento de modelos experimentais de acidúria etilmalônica e de acidúria metilsucínica em ratos através de injeções subcutâneas dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, respectivamente.
7. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos.

8. Ação *in vivo* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os mesmos parâmetros do sistema glutamatérgico estudados no presente trabalho em córtex cerebral de ratos.
9. Ação *in vivo* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os parâmetros de estresse oxidativo estudados neste trabalho, bem como em outros tecidos como músculo esquelético e cardíaco.

VIII. REFERÊNCIAS

- Abe, T., Sugihara, H., Awa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol.Chem.* 267: 13361-13368.
- Allen, R.G., Trensini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radicals in Biology & Medicine* 28 (3): 463-499.
- Aramori, I., Nakanishi, S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8: 757-765.
- Artola, A., Singer, W. (1987) Long term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* 330: 649-652.
- Balcar, V.J., Li, Y. (1992) Heterogeneity of high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate in the mammalian Central Nervous System. *Life Sci.* 51: 1467-78.
- Bannai, S. (1986) Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 261: 2256-63.
- Barbour, B., Brew, H., Attwell, D. (1988) Eletrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335: 433-35.
- Beadle, G.W. (1945) *Chem Ver* 37:15-21.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996) NO●, O₂●- and ONOO-: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology.* 271: C1424.
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., Ferencik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65, 1865-1874.
- Bettler, B., Mulle, C. (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacol.* 34: 123-139.

- Bhala, A., Willi, S. M., Rinaldo, P., Bennett, M. J., Schmid-Sommerfeld, E., Hale, D. E. (1995) *J. Pediatr.* 126:910-915.
- Billups, B., Mulle, C. (1996) Review: neurotransmitter receptor II. AMPA and Kainate receptors. *Neuropharmacology* 34: 123-139.
- Brackett, J.C., Sims, H.F., Rinaldo, P. *et al* (1995) Two α subunit donor splice site mutations cause human trifunctional protein deficiency. *J.Clin.Invest.* 151: 121-126.
- Brightman, M.W., Cheng-Tao, J.H. (1998) Cell membrane interactions between astrocytes and brains endothelium, In: *The biochemical pathology of astrocytes* (Norenberg, M.D., Hertz, L., Schousboe, A., eds.) pp:21-39, Alan R.Liss, New York, NY.
- Brusilow, S.W., Traystman, R.J. (1986) Letter to editor. *N.Engl.J.Med.* 314:786.
- Burlina, A.B.; Dionisi-Vinci, C.; Bennett, M.J. *et al* (1994): A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts. *J Pediatr*, 124: 79-86.
- Burton, B.K. (1987) *Inborn Errors of Metabolism: the clinical diagnosis in early infancy.* *Pediatrics* 79:359.
- Carrel, R.W., Gooptu, B. (1998) Conformational changes and disease – Serpins, Prions and Alzheimer's. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 799-809.
- Cassarino, D.S., Bennett, Jr, J.P. (1999) 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.
- Chalmers, R.A., Purkiss, P., Watts R.W.E., Lawson, A.M. (1980) Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J. Inher. Metab. Dis.* 3: 27-29.
- Chalmers, R.A., Lawson, A.M. (1982) *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias.* 1^a ed. London: Chapman and Hall.

- Cho, Y., Bannai, S. (1990) The role of glutamate and cystine in C-6 glioma cells and cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 55:2091-97.
- Coitinho, A.S., Mello, C.F., Lima, T.T.F., Bastiani, J., Figuera, M.R., Wajner, M. (2001) Pharmacological evidence that α -ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Brain Research*, 894:68-73.
- Collingridge, G.L., Lester, R.A. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 41:143-210.
- Conn, P.J., Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-37.
- Cooper, A.J.L., Plum, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67: 440-519.
- Cooper, A.J.L., Mc Donald, J.M., Glebard, A.S., Gledhill, R.F., Duffy, T.E. (1979) The metabolic fate of ^{13}N -labelled ammonia in rat brains. *J. Biol. Chem.* 254: 4982-992.
- Corydon, M. J., Gregersen, N., Lehnert, W., Ribes, A., Rinaldo, P., Kmoch, S., Christensen, E., Kristensen, T. J., Andresen, B. S., Bross, P., Winter, V., Martinez, G., Neve, S., Jensen, T. G., Bolund, L., Kolvraa, S. (1996). Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Pediatr. Res.* 39:1059-1066.
- Daiklin, Y., Yudkoff, M. (2000) Glutamate and Glutamine in the brain: compartmentation of brain Glutamate metabolism in neurons and glia. *American Society for Nutritional Sciences* 1026-1031.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M.M.R., Schröder, N., Quevedo, J., Benfato, M.S., Moreira, J.C.F., Walz, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or Kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters*, 2000(b), 29(3): 179-182.
- Danbolt, N.C. (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progr. Neurobiol.* 44:377-96.

- Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65: 1-105.
- Dawson, D.B.; Waber, L.; Hale, D.E. et. al. (1995): Transient organic aciduria and lacticacidemia in a patient with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*, 126(1): 69-71.
- Delanty, N., Dichter, M.A. (1998) Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* 98:145-153.
- Dennis, S.C., Land, J.M., Clark, J.B. (1976) Glutamate metabolism and transport in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 156: 323-31.
- Domercq, M., Mamute, C. (1999) Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res. Mol.* 67: 296-302.
- Duvoisin, R.M., Zhang, C. Ramonell, K. (1995) *J.Neurosci.* 15: 3075-3083.
- Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.*, 320: 345-357.
- Elias, E., Gray, R.G.F., Poulton, K., Green, A. (1997) Ethylmalonic adipic aciduria – a treatable hepatomuscular disorder in two adult brothers. *Journal of Hepatology*, 26: 433-436.
- Emanuelli, T., Antunes, V.F., Souza, D.O. (1998) *Biochem.Mol.Biol.Int.* 44: 1265-1272.
- Erecinska, M., Zaleska, M.M., Nelson, D., Nissim, I., Yudkoff, M. (1988) Glucose and the metabolism of [^{15}N]glutamine in synaptosomes. *J.Neurochem.* 51: 892-902.
- Erecinska, M., Silver, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35: 245-96.
- Evans, R.H., Francis, A.A., Hunt, K., Oakes, D.J. (1979) Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal of the frog. *Br.J.Pharmacol.* 67: 591-603.

- Fontella, F., Pulrolnik, V., Gassen, E., Wannmacher, C.M.D., Klein, A.B., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport*. 28;11:541-4.
- Fillenz, M. (1995) Physiological release of excitatory amino acids. *Behav. Brain Res.* 71: 51-67.
- Fykse, E.M., Fonnum, F.J. (1996) Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem.Res.* 21: 1053-60
- Fykse, E.M., Iversen, E.G., Fonnum, F. (1992) Inhibition of L-glutamate uptake into synaptic vesicles. *Neurosci.Lett.* 135: 125-28.
- Garrod, A.E. (1908) Inborn errors of metabolism *Lancet* 2:1
- Gegelashvili, G., Schousboe, A. (1998) Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull* 45: 233-38.
- Gibson, Q.H. (1948) *Biochem. J.* 42: 13-18
- Golpertz, D. (1974) Inborn Errors of Organic Acid Metabolism. *Clin. Endocrinol. Metab*, 3: 107.
- Gonzalez-Flecha, B., Llesuy, S. & Boveris, A. (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, 10:93-100.
- Gundersen, V., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J. (1993) Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* 57: 97-111.
- Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*. 344:721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. New York, 3rd edition.

- Hoffmann, C.F., Meier-Augenstein, W., Stocker, S., Surtees, R., Rattig, D., Nyhan, W.L. (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 648-669.
- Hoffmann, G.F. (1994) Selective screening for inborn errors of metabolism – past, present and future. *Eur. J. Pediatr.* 153 (Suppl. 1): S2-S8.
- Hoffmann, G.F., Gibson, K.M., Trefz, F.K., Nyhan, W.L., Bremer, H.J., Rating, D. (1994) Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur. J. Pediatr.* 153 [Suppl.1]: S94-100
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.
- Hollmann, M., O'shea-Greenfield, A., Rogers, S.W., Heinemann, S. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature (Lond.)* 342: 643-648.
- Houamed, K.M., Kuijper, J.L., Gilbert, T.L., Haldeman, B.A., O'hara, J.P., Mulvihill, E.R., Almers, W., Hagen, F.S. (1991) *Science* 252: 1318-1321.
- Insel, T.R., Miller, L.P., Gelhard, R.E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain: I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35: 31-43.
- Ito, M. (1989) Long-term depression. *Ann. Rev. Neurosci.* 12:85-102.
- Izquierdo, I. (1994) Pharmacological evidence for a role of a long-term potentiation in memory. *Faseb J.* 8: 1139-1145.
- Jahr, C.E., Stevens, C.F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325: 522-525.
- Jackson, S., Kler, R.S., Barlett, K., *et al* (1992) Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation. *J.Clin.Invest.* 90:1219-1225.

- Johnston, G.A.R. (1981) Glutamate uptake and its possible role in neurotransmitter inactivation, In: Glutamate: transmitter in the Central Nervous System, pp. 77-87. Eds. P.J. Roberts, J. Storm-Mathisen and G.A.R. Johnston. John Wiley: Chichester.
- Kakinusa, A. (1998) Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? Trends in Genetics 14(10): 369-402.
- Kanai, Y., Hediger, M.A. (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature 360: 467-71.
- Kondo, K., Hashimoto, H., Kitanara, J., Sawada, M., Sukumura, A., Marunouchi, T., Baba, A. (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. Neurosci.Lett. 188: 140-142.
- Krämer, R., Palmieri, F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. Biochem.Biophys.Acta 974: 1-23.
- La Du, B.N., Zannoni, V.A., Laster, L., Seegmiller, J.E. (1958) J.Biol.Chem. 230: 251-260
- Leipnitz, G., Schuck, P.F., Ribeiro, C.A.J., Dalcin, K.B., Assis, D.R., Barschak, A.G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Wajner, M. Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats *in vitro*. Aceito para publicação no Neurochemical Research , 2002.
- Levy, L.N., Lehre, K.P., Rolstad, B., Danbolt, N.C. (1993^a) A monoclonal antibody raised against an [Na⁺ + K⁺] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. FEBS Lett. 317: 79-84.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A. (1994) The New Eng. J. Med. 330: 613-622.
- Lissi, E., Pascual, C., Del Castillo, M.D. (1992) Luminol induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. Free Rad. Comms.17, n°5, 299-311.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193:265-75.

- Mackler, S.A., Eberwine, J.H. (1993) *Molec. Pharmacol.* 44: 308-315.
- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. *Basic Medical Biochemistry: a clinical approach* (1996)
- Masu, M., Tanabe, Y., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349: 760-765.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Castro, I.N. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry.* 32: 595-603.
- Mckenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., Zielke, H.R. (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J.Neurochem.* 66:386-393.
- Michaelis, E.K. (1998) *Progress in Neurobiology*, 54: 369-415. AMPLIAR LISI
- Miller, L.P., Johnson, A.E., Gelhard, R.E., Insel, T.R. (1990) The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain: II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* 35: 45-51.
- Moyano, D., Vilaseca, M.A., Pineda, M., Campistol, J., Vernet, A., Póo, P., Artuch, R., Sierra, C. (1997) Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin. Chim. Acta.* 263: 147-155.
- Monaghan, D.T., Cotan, C.W. (1982) *Brain Res.* 191: 387-430.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., Cotman, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- Mori, H., Mishima, M. (1995) Review: Neurotransmitter receptors VIII, structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219-37.
- Moriyama, Y., Maeda, M., Futai, M. (1990) Energy coupling of L-glutamate transport and vacuolar H⁺-ATPase in brain synaptic vesicles. *J.Biochem.* 108: 689-93.

- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., Cyle, J.T. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547-58.
- Naito, S., Ueda, T. (1983) Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J.Biol.Chem.* 258: 696-99.
- Naito, S., Ueda, T. (1985) Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J.Neurochem.* 44: 99-109.
- Nakamura, Y., Iga, K., Shibata, T., Shudo, M., Kataoka, K. (1993) Glial plasmalemmal vesicles – a subcellular fraction from rat hippocampal homogenate distinct from synaptosomes. *Glia* 9: 48-56.
- Nakao, S., Moriya, Y., Furuyama, S., Niederman, R., Sugiya, H. (1998) Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biology International* 22:331-337.
- Olney, J.W. (1980) Excitotoxic mechanisms of neurotoxicity. In: Spencer P.S., Schaumburg, H.H., eds. *Clinical and Experimental Neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 272-294.
- Olney, J.W. (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:47-71.
- Ozawa, s. haruyuki, k., tsuzuki, k. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54: 581-618.
- Patneau, D.K., Wright, P.W., Winters, C., Mayer, M.L., Gallo, V. (1994) Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate- and AMPA-preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron* 12: 357-371.
- Pettenuzzo, L.F., Schuck, P.F., Fontella, F.U., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Netto, C.A., Wajner, M. (2002) Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73:623-629.

- Pin, J.P., Duvoisin, R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.*, 34:1-26.
- Porciúncula, L., Dal-Pizzol Jr., A., Coitinho, A.S., Emanuelli, T., Souza, D. O., Wajner, M. (2000) Inhibition of synaptosomal [H^3]glutamate uptake and [H^3]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid *in vitro*. *Journal of the Neurological Sciences*, 173: 93-96.
- Pourfazam, M., Schaefer, J., Turnbull, D.M., Barlett, K. (1994) Analysis of fatty acid oxidation intermediates in cultured fibroblasts to detect mitochondrial oxidation disorders. *Clin. Chem.* 40:2267-2275.
- Quintana, L.P., Crespo, P.S. (2001) Aproximación diagnóstica y tratamiento de los errores innatos de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. *Annales Españoles de Pediatría* 55, nº 6, 524-534.
- Ramos, M., Souza, S.O., Ramirez, G. (1997) Specific binding of [$3H$]GppNHp to extracellular membrane receptors in chick cerebellum: possible involvement of kainic acid receptors. *FEBS Letters* 406: 114-118.
- Rashed, M., Ozand, P.T., Aqeel, A, Gascon, G.G. (1994) Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders. *Brain Develop.*; 16 (Suppl): 1-6.
- Ribes, A.; Riudor, E.; Garavaglia, B. *et al.* (1998) Mild or absent clinical signs in twin sisters with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Eur. J. Pediatr.*, 157: 317-320.
- Rinaldo, P. (2001) Fatty Acid Transport and Mitochondrial Oxidation Disorders. *Seminars in Liver Disease*, vol. 21, number 4, 489-499.
- Rinaldo, P., Rayond, K., Al-Odaib, A, Bennett, M.J. (1998). Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Current Opinion in Pediatrics* 10: 615-621.

- Roe, C.R., Coates, P.M. (2001) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In Scriver, C.R., Beaudet, A. L.; Sly, W. L.; Valle, D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. 8th ed. New York, McGraw-Hill, 1501-1535.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-25.
- Saugstad, J.A., Kinzie, J.M., Shinohara, M.M., Segerson, T.P., Westbrook, G.L. (1997) Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Molec. Pharmacol.* 51: 119-125.
- Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Stürenberg, H., Mann, U., Müller-Thomsen, T., Beisiegel, U. (2000). Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radicals in Biology & Medicine*, 28(3): 351-360.
- Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A.J., Dalcin, Assis, D.R., Barschack, A.G., Pulrolnik, V., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Wajner, M. Inhibition of creatine kinase *in vitro* by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochemical Research*, 2002 Dec;27(12):1633-9.
- Scriver, C.R., Beaudet A.L., Sly, W.S., Valle, D. (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Seeburg, P.H. (1993) The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor. *Trends Neurosci.* 16: 359-365.
- Sewell, A.C., Herwig, J., Böhles, H., Rinaldo, P., Bhala, A., Hale, D. E. (1993). A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *Eur. J. Pediatr.* 152:922-924.
- Sies, H., Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (suppl): 1315S-1321S.
- Sims, K.D., Robinson, M.B. (1999) A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann.Clin.Biochem.* 19: 314-21.

- Sinclair, L.A. (1982) A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann. Clin. Biochem.* 19: 314-21.
- Spiridon, M., Kamm, D., Billups, B., Mobbs, P., Atwell, D. (1998) Modulation by Zinc of the glutamate transporter in glial cells and cones isolated from the tiger Salamander retina. *J.Physiol.(Lond)* 506: 363-76.
- Stryer, L. *Bioquímica*, 4ª ed. Editora Guanabara Koogan, 1996.
- Sweetmann, L. Organic acid analysis. In: Hommes, FA (ed.) (1995) *Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual.* 1a ed. New York: Wiley-Liss; 143-176.
- Tabb, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R., Ueda, T (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles-roles of membrane potential, pH gradient and intravesicular pH. *J.Biol.Chem.* 267: 15412-15418.
- Takahashi, H., Koehler, R.C., Brusilow, S.C., Traystman, R.J. (1991) Inhibition of brains glutamine accumulation prevents cerebral edema in hiperammonemic rats. *Am. J. Physiol.* 261:H825-H829.
- Takahashi, M., Billups, B., Rossi, D., Sarantis, M., Hamann, M. Attwell, D. (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J.Exp.Biol.* 200:401-409.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-179.
- Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* 13: 1372-1378.
- Tanaka, K., Budd, M.A., Efron, M.L., Isselbacher, I. Isovalericacidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56: 236-239.
- Tanaka, K. (2000) Functions of glutamate transporters in the brain. *Neuroscience Research* 37: 1372-78.

- Tein, I., Haslam, R.H.A., Rhead, W. J., Bennett, M. J., Becker, L. E., Vockley, J. (1999). Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology*. 52(2): 366-372.
- Thomas, M.J. (2000) The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*. 16: 716-718.
- Vockley, J., Whitemann, D.A.H. (2002) Defects of mitochondrial β -oxidation: a growing group of disorders. *Neuromuscular Disorders* 12: 235-246.
- Wadiche, J.I., Amara, S.G., Kavanaugh, M.P. (1995a) Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15: 721-28.
- Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Gaidzinski, D. and Dutra-Filho, C.S. (1986). Detection of inborn errors of metabolism in patients of paediatric intensive care units of Porto Alegre, Brazil. Comparison between the prevalence of such disturbances in a selected and an unselected sample. *Brazilian Journal of Genetics*, IX: 331-340.
- Warrs, R.W.E.; Chalmers, R.A.; Lawson, A.M. (1975). Abnormal organic acidurias in mentally retarded patients. *Lancet*, 1:368,.
- Watkins, J.C., Krogsgaard-Larsen, P., Honoré, T. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 25-33.
- Wenthold, R.J., Trumpy, V.A., Zhu, W.S., Petralia, R.S. (1994) Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies. *J.Biol.Chem.* 269: 1332-1339.
- Wolosker, H., D.O.G., De Meis, L.J. (1996) Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem.* 271:11726-731
- Wood, P.A., Hinsdale, M.E., Hamm, D.A. (1989) Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice. *Pediatr. Res.* 25: 38-43.
- Zerangue, N., Kavanaugh, M.P. (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383: 634-637.

Yagi, K. (1998) Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in Serum or Plasma. *Methods in Molecular Biology* 108: 101-107.

Yudkoff, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D., Erecinska, M. (1989) Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with [15N]glutamine. *J.Neurochem.* 53: 632-40.